



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사 학위논문

**MiR-148a의 간세포 손상 및
간세포암 악성화 제어 기전**

**MiR-148 as an inhibitory regulator of hepatocyte injury
and hepatocellular carcinoma progression**

2017년 8월

서울대학교 대학원

약학과 약물학 전공

허 미 정

MiR-148a의 간세포 손상 및 간세포암 악성화 제어 기전

MiR-148 as an inhibitory regulator of hepatocyte injury and hepatocellular carcinoma progression

허 미 정

지도교수: 김 상 건

마이크로RNA는 세포의 생존, 사멸, 재생 및 염증 반응 등을 조절하며, 이는 만성적인 간질환의 진행과 연계되어 있다. 또한 마이크로RNA의 불균형은 간세포암의 예후에 영향을 미친다. 그러나 아직까지 만성 간질환 이행과 간세포암의 악성화를 종합하는 조절자로서 마이크로RNA에 대한 연구는 부족하다. 따라서 만성 간질환과 간세포암의 악성화에 공통적으로 관여하는 신호조절자인 마이크로RNA 및 이를 매개하는 분자에 대한 연구가 필요하다.

과도한 알코올 섭취는 지방간, 간염, 간경변증 및 간세포암을 포함하는 알코올성 간질환을 유발하며 만성 간질환의 주 원인이다. 알코올성 간염이 진행되면 간섬유화를 동반하고 간경변으로 심화되며 간세포암으로 발전한다. 간세포암은 재발율이 높고 빈번한 전이로 인하여 예후가 좋지 않다. 알코올성 간질환 및 간세포암은 조기 진단의 어려움이 있고, 효과적인 치료를 위한 진단 마커가 부족하며 치료 약제

및 치료 전략이 불충분하다. 본 연구에서는 알코올로 인한 간세포 손상을 제어하고 간세포암의 진행을 억제하는 신규 마이크로RNA를 발굴하고, 해당 유전자의 병태생리적 기능 및 조절 기전을 탐구하고자 하였다. 이를 위하여 1) 간염 환자와 알코올 섭취 동물 모델을 사용하여 알코올에 의한 마이크로RNA 변화 분석과 이에 따른 간세포 손상 기전 탐구, 2) 간세포암 환자 및 이중이식 동물을 이용하여 간세포암에서 마이크로RNA 변화 및 타겟 분자 도출을 통한 간세포암 악성화 기전 탐구를 구체적 연구 목표로 설정하였다.

알코올성 간염 환자 및 알코올 투여 동물모델에서 miR-148a의 발현이 감소함을 관찰하였다. 또한 알코올성 간염 환자의 마이크로어레이 네트워크 분석을 통해 알코올에 의한 교란 신호 조절의 핵심 유전자로 FoxO1을 도출하였고, 알코올 처리시 FoxO1이 감소함을 확인하였다. FoxO1과 miR-148a의 발현은 상관성이 높았고, 세포 실험을 통해 FoxO1이 miR-148a의 전사인자임을 확인하였다. MiR-148a는 직접적으로 TXNIP의 발현을 억제하였다. 알코올에 의한 TXNIP의 발현 증가는 NLRP3 inflammasome의 활성화를 촉진하고 간세포의 pyroptosis를 유도하였으며, 이는 miR-148a 과발현 또는 TXNIP의 발현 억제에 의해 감소하였다. 렌티바이러스를 이용하여 miR-148a를 간세포 선택적으로 과발현시 알코올에 인한 간세포의 손상이 억제되었다.

미세혈관 침습이 있는 간세포암 환자의 시료에서 miR-148a의 발현은 감소하였고, miR-148a의 발현 감소에 따라 간세포암 환자의 전체 생존률과 무재발 생존률이 감소하였다. USP4의 발현은 간세포암 환자에서 증가하였고, 세포 실험에서 miR-148a이 직접적으로 USP4의 발현을 억제함을 증명하였다. MiR-148a의 감소에 따른 USP4의 발현

증가는 중간엽성 간암세포주에서 현저하였고, 이는 암세포의 이동과 증식을 촉진하였다. MiR-148a와 USP4의 역상관성을 간세포암 환자 및 이종이식동물 모델에서 확인하였다. 또한 환자 유래 간암 이종이식 동물 모델에서도 miR-148a의 발현이 감소하는 G1과 G2 암세포에서 USP4의 발현이 증가했으며, 이는 종양 이식의 단계가 진행되어도 miR-148a와 USP4의 역상관성이 유지됨을 의미한다.

종합할 때, 본 연구결과는 간세포 손상을 제어하고 간세포암의 진행을 억제하는 miR-148a의 새로운 기능 및 조절기전을 제시한다. 알코올성 간세포 손상을 제어하는 신규 조절자로서 miR-148a의 발견과 그 상위 조절 전사인자로서 FoxO1의 발굴, 하위 염증성 세포사멸을 일으키는 단백질로 TXNIP를 도출하였다. 또한 간세포암의 악성화에 관여하는 miR-148a 신호 회로를 밝혔으며, 타겟 유전자의 발현 억제를 통한 암세포의 증식 및 이동성 억제 효능을 검증하였다. 이러한 성과는 간질환을 이해하고 이를 활용하여 질병을 치료하는 원리를 도출하는데 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

주요어: 알코올성 간질환, 간세포암, FoxO1, inflammasome, migration, miR-148a, proliferation, pyroptosis, TXNIP, USP4

학번: 2012-31115

목 차

국문요약	i
목차	iv
List of figures	vi
List of table	vii
List of abbreviations	viii
I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	
시약 및 재료	6
인체 조직 시료	6
병리 동물모델	7
세포 배양	7
마이크로RNA의 Realtime RT-PCR	8
cDNA의 Real-time RT-PCR	9
조직학적 검사	10
생물정보학적 분석	10
면역화학적 분석 (Immunoblot analysis)	11
세포 분획법	11
형질도입 (Transfection)	11
리포터 유전자 분석 (Reporter gene assay)	12

3'UTR 리포터 유전자 분석	13
염색질면역침전법 (Chromatin immunoprecipitation assays).....	13
유세포측정법	13
면역침강법	14
렌티바이러스 (lentivirus)를 이용한 세포 선택적 유전자 전달	14
체외 세포의 이동성 분석법	15
MTT 정량 분석법	15
통계분석	16

III. 연구결과

1. 알코올에 의한 간세포 손상 모델에서 miR-148a의 발현 변화	17
2. 알코올에 의한 간세포 손상 모델에서 FoxO1의 발현 변화	20
3. FoxO1에 의한 전사적 miR-148a의 발현 조절.....	23
4. 알코올에 의한 간세포 손상 모델에서 miR-148a에 의한 TXNIP 발현조절	26
5. TXNIP 의존적 inflammasome에 의한 간세포의 pyroptosis..	31
6. 알코올에 의해 손상된 간세포에서의 inflammasome 활성화...	35
7. 간세포 선택적 miR-148a 발현에 의한 간세포 손상 억제..	38
8. MiR-148a 변화에 따른 간세포암의 진행	41
9. 중간엽성 간암세포주에서 USP4의 발현 변화	46
10. MiR-148a에 의한 USP4의 발현 변화	48

11. USP4 의존적 TGF β 신호 조절.....	50
12. 종양 이식 동물 실험.....	53
 IV. 고찰	57
 V. 참고문헌	67
 VI. Abstract	79
VII. Curriculum Vitae	82
VIII. 감사의 글	86

List of figures

Figure 1. Dysregulation of miR-148a in AH patients or ALD animal models	18
Figure 2. Inhibition of FoxO1 in AH patients or ALD animal models....	21
Figure 3. Transcriptional induction of MIR148A by FoxO1	24
Figure 4. TXNIP overexpression as a result of miR-148a dysregulation by ethanol	28
Figure 5. Pyroptosis of hepatocytes as mediated by TXNIP-dependent Inflammasome activation	33
Figure 6. Ethanol-induced inflammasome activation in hepatocytes of mice treated with clodronate	36
Figure 7. Inhibition of inflammasome and liver injury after hepatocyte specific lentiviral delivery of miR-148a	39
Figure 8. Survival and MVI rates of HCC patients in association with miR-148a dysregulation	43
Figure 9. Comparisons of USP4 and E-cadherin levels in liver-tumor cell lines	47
Figure 10. Inhibition of USP4 translation by miR-148a	49
Figure 11. The effect of USP4 on tumor cell migration and growth	51
Figure 12. Analyses of miR-148a and its target expression levels in original HCC or engrafted tumors	54

List of table

Table 1. Correlation between miR-148a levels and clinico-pathological characteristics in human primary HCC specimens.....	45
--	-----------

List of abbreviations

AH: alcoholic hepatitis

ALD: alcoholic liver disease

ASC: Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD

EMT: epithelial-mesenchymal transition

FoxO1: Forkhead box protein O1

HCC: hepatocellular carcinoma

IL-1: interleukin-1

NLRP3: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3

MicroRNA: miRNA

MVI: micronvascular invasion

NT: non-tumorous tissue

PDX: patient-driven xenograft

PI: propidium iodide

RE: response element

ROS: reactive oxygen species

TβRI: transforming growth factor-β receptor type I

TGF-β: transforming growth factor-β

TNFα: tumor necrosis factor α

TNM: tumor node metastasis

TXNIP: thioredoxin interacting protein

UPP: ubiquitin-proteasome pathway

USPs: ubiquitin specific proteases

UTR: untranslated region

I. 서론

마이크로RNA(microRNA, miRNA)는 표적 mRNA에 특이적으로 결합하여 mRNA의 안정성을 낮추거나 번역을 저해하는 작은 크기의 단일 가닥 RNA로, 유전자 발현에 관여하여 세포의 발달, 분화, 증식과 세포 사멸, 이동과 같은 필수적인 생명 현상을 조절한다(Borel *et al.*, 2012). 또한 마이크로RNA는 안정성이 비교적 높아 암을 포함한 만성 질환에 있어 바이오마커로 주목받고 있다(Giordano *et al.*, 2013). 하나의 마이크로RNA는 수백 가지의 표적 유전자를 조절할 수 있으며, 단일 표적 유전자는 다수의 마이크로RNA에 의해 조절될 수 있기 때문에 마이크로RNA의 발현 변화는 생체내 신호 회로의 변화를 유도하여 다양한 질환의 발병 및 진행에 핵심적인 역할을 한다고 볼 수 있다.

지속적인 마이크로RNA 결핍은 간세포의 사멸, 재생 및 염증을 유발하며, 이는 만성적인 간질환의 진행과 연계되어 있다(Wang *et al.*, 2012). 최근 알콜 및 비알콜성 지방간, 간염을 포함한 만성적인 간질환과 간세포암의 발병 및 진행에 있어 마이크로RNA의 발현 변화 및 역할이 보고되었다(Szabo *et al.*, 2013). 그러나 아직까지 마이크로RNA의 감소에 따른 만성 간질환 이행 및 간암의 악성화와 이를 매개하는 조절자에 대한 연구는 부족하다. MiR-148a는 간에 많다고 알려진 마이크로RNA로, 간세포암을 포함한 몇 종의 암에서 발현 저하가 보고되었다(Barad *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2013). 그러나 miR-148a의 발현 변화에 따른 간세포 손상 및 간세포암 악성화에 대한 기전 연구는 미비하다.

과도한 알코올 섭취는 지방간, 간염, 간경변증 및 간세포암을 포함하는 알코올성 간질환(alcoholic liver disease, ALD)을 유발하며, 이는

만성적 간질환의 주요 원인이다(Gao *et al.*, 2011). 중국과 인도 등에서 알코올 소비가 증가함에 따라 세계적으로 알코올성 간질환의 발병율은 계속 증가하고 있다(Liangpunsakul *et al.*, 2016). 흡수된 알코올의 대부분은 간의 실질세포인 간세포에서 대사되며, 이 과정에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)나 대사 산물인 아세트알데히드 그리고 염증성 사이토카인 등이 간세포에 직접적으로 영향을 미친다(Orman *et al.*, 2013). 알코올에 의한 간세포 손상시 노산이나 ATP와 같은 sterile danger signals을 방출되며(Iracheta-Vellve *et al.*, 2015), 손상된 간세포에서 분비되는 이러한 신호들은 다양한 염증반응을 활성화시켜 알코올성 간질환을 심화시킨다. 만성적인 알코올의 섭취는 알코올성 간염(alcoholic hepatitis, AH)으로 이행되는데, 간경변증을 동반한 알코올성 간염은 예후가 불량하며 서구에서는 종종 알코올성 간염 환자의 사망률이 ~50%에 이른다(Gao *et al.*, 2011; Orrego *et al.*, 1987). 하지만 알코올성 간질환은 조기 진단의 어려움이 있고 효과적인 치료를 위한 진단 마커가 부족하며, 아직까지 치료 약제 및 치료 전략이 불충분하다.

간세포암(hepatocellular carcinoma, HCC)은 전세계적으로 발생 빈도가 높고 사망률은 더 높은 질환이다. 간세포암은 특별한 증세가 없어 암이 진행된 상태에서 진단되는 경우가 많고 수술 이후 재발율이 높으며 빈번한 전이로 인하여 예후가 좋지 않다(Thorgeirsson *et al.*, 2002). 초기 간세포암 환자에는 국소 절제술 또는 간 이식술이 가능하지만, 수술 가능한 환자의 비율은 전체 간세포암 환자의 20%정도만 해당되며 수술 이후 재발율이 높고, 진행성 간세포암의 경우 효과적인 치료 약제가 미비하다(Kishi *et al.*, 2011). 또한 만성적인 알코올 섭취는 간세포암의 발생율을 높이며(Tagger *et al.*, 1999; Hassan *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 1991),

지속적으로 알코올을 섭취한 간세포암 환자의 예후는 불량하였다(Wang *et al.* 2015). 따라서 알코올성 간질환 및 진행성 간세포암 환자의 효과적인 치료를 위해 만성 간질환과 간세포암의 악성화에 공통적으로 관여하는 신호조절자 및 이를 매개하는 분자 기전에 대한 연구가 필요하다.

간세포에서 알코올이 대사될 때 생성되는 활성산소종으로 인해 미토콘드리아 기능이 상실되며, 이때 염증성 사이토카인에 대한 간세포의 감수성은 커지고 간세포의 손상이 촉진된다(Miñana *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). 알코올성 간염 환자에서 염증성 사이토카인인 종양괴사인자알파(tumor necrosis factor alpha, TNF α)와 interleukin-1(IL-1)이 증가해있다(Colmenero *et al.*, 2007; Khoruts *et al.*, 1991). 최근 면역세포 및 전신 염증에 의한 사이토카인의 분비 뿐만 아니라 간세포에서도 NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3(NLRP3) inflammasome 의존적으로 IL-1 β 가 분비된다고 보고되었다(Geng *et al.*, 2015). NLRP3 inflammasome은 NLRP3, Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing CARD(ASC), 그리고 pro-caspase-1로 구성된 다당백 복합체로, inflammasome family 중에서 가장 잘 알려져 있으며 다양한 간질환에 관여한다고 보고되었다(Szabo *et al.*, 2012). 먼저 NLRP3 inflammasome 구성 요소가 전사적으로 증가한 뒤, 구성 단백질이 결합체를 형성하여 활성화된다. 이때, 잘려진 caspase-1이 세포의 죽음을 유도하고, IL-1 β 를 분비시킨다. 하지만 알코올에 의한 간세포 손상시, 간세포내에서 inflammasome의 역할 및 병리 기전에 대한 연구는 미비하다. 본 연구에서는 알코올성 간염 환자 및 알코올 투여 동물모델에서 miR-148a의 변화를 관찰하고 그 기능을 연구하고자 하였다. MiR-148a의 감소에 따른 타겟 분자의 발현 변화와 그로 인한 NLRP3 inflammasome 활성화를 경유한 간세포 손상

기전을 규명하고자 하였다. 또한 miR-148a의 상위 조절자로 알코올에 의한 간세포 손상에 관여하는 전사인자를 탐구하였다. 나아가 간세포 선택적 miR-148a 전달 시스템을 이용하여 알코올성 간질환에 있어 miR-148a의 치료적 효과를 탐구하였다.

간세포암에서 전환성장인자(transforming growth factor- β , TGF- β)는 수용체인 T β RI를 통해 상피-중간엽성 이행(epithelial-mesenchymal transition, EMT)을 유도하고 암세포의 전이능을 높인다(Muraoka *et al.*, 2002). 상피세포가 극성을 잃고 세포간 부착력이 저하되며 세포모양이 섬유아세포형으로 바뀌어 전이능력과 침윤능력을 가지는 세포로 변환하는 과정을 상피-중간엽성 이행이라고 하며, 상피-중간엽성 이행은 항암제의 저항성을 유도한다(Wang *et al.*, 2011). 상피성 간세포암에 비해 중간엽성 특징을 가진 간세포암은 혈관 침습과 타 장기로의 전이가 용이하며 그 결과 환자의 예후가 불량하다(Jou *et al.*, 2010).

진핵세포에서 대부분의 단백질은 유비퀴틴-프로테아좀 경로 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP)를 통해 분해되며 이는 세포내 항상성 유지와 밀접한 관련이 있다(Pickart *et al.*, 2004). 즉, 세포 사멸, 세포 주기, 세포 소기관의 생합성 등 세포 내 신호 경로와 관련된 단백질이 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 통해 선택적으로 분해됨으로써 세포의 생리적 기능이 조절되는 것으로 알려졌다. 유비퀴틴 특이적 분해효소(ubiquitin specific proteases, USPs)는 기질에 유비퀴틴이 결합하는 것을 억제함으로써 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 저해하여 타겟 기질의 전사 후 조절인 단백질 분해를 조절한다(Fraile *et al.*, 2012). 따라서 유비퀴틴 특이적 분해효소는 세포주기, DNA 수정, 세포 신호 전달과 같은 다양한 생체 과정에 영향을 준다. 다양한 유비퀴틴 특이적 분해효소는 암 발생과 관련된 단백질의

분해 조절에 관여하며, 이들은 종양 억제자(tumor suppressor) 또는 종양 유발자(oncogene)로 분류되었다. 최근 몇 개의 유비퀴틴 특이적 분해효소(예, USP4, 11, 15)가 TGF- β 신호를 활성화시켜 암세포의 침습과 전이 및 악성화에 관여한다고 보고되었다(Aggarwal *et al.*, 2012; L. Zhang *et al.*, 2012). 그러나 간세포암에서 종양유발자로서의 유비퀴틴 특이적 분해효소 발현 및 그 상위 조절자에 대한 연구는 미비하다. 본 연구에서는 간세포암의 악성화에 있어 miR-148a의 발현 변화를 관찰하고 그 기능을 연구하고자 하였다. MiR-148a의 발현 감소가 간세포암 환자의 예후에 영향을 미치는지를 분석하고, TGF- β 신호와 관련된 암세포의 악성화에 관여하는 타겟 분자를 도출하였다. 또한 miR-148a 신호 경로가 종양세포에 미치는 기능을 연구하였다.

본 연구에서는 간세포 손상을 제어하고 간세포암 진행을 억제하는 신규 마이크로RNA를 도출하고 그 제어 기전을 규명하였다. 알코올로 인한 간세포 손상을 제어하는 신규 조절자로서 miR-148a와 그 상위 전사인자 Forkhead box protein O1(FoxO1) 및 하위 신호로 작용하는 thioredoxin interacting protein(TXNIP)의 조절을 통한 생리적 기능을 새롭게 제시하였다. 또한 간세포암의 악성화에 관여하는 miR-148a 신호 회로를 도출하고 타겟 유전자인 USP4의 발현 억제를 통한 암세포의 증식 및 이동성 억제 효능을 검증하였다.

II. 연구재료 및 방법

II-1. 시약 및 재료

FoxO1, IL-1 β , NLRP3, Smad2와 p-Smad2 항체는 Cell Signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. TXNIP, NLRP3, ASC, USP4와 TGF β R1 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)으로부터 구매하였다. Caspase-1, CYP2E1, FoxO3a와 USP4 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 공급받았다. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit과 goat anti-mouse IgGs는 Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA)에서 구입하였고, β -actin 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit IgG, Fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG과 Alexa Fluor 568-conjugated anti-mouse IgG는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다.

II-2. 인체 조직 시료

알코올성 간질환 환자의 시료는 hospital clinic of Barcelona (Barcelona, Spain)에서 2011년에서 2015년 사이 알코올성 간염으로 진단받은 환자와 정상인의 간조직들을 사용하였다. 간세포암 환자의 시료는 서울아산병원 (Seoul, Korea)에서 2006년과 2009년 사이에 외과적으로 암 제거 수술을 받고 시료를 기증한 59명 간세포암 환자들의 암 조직과 주변 정상 조직들을 사용하였다. 간 병리학자의 판독 하에 미세혈관침습을 보이는(microvascular invasion, MVI) 19개의 암조직과 이들과 tumor node metastasis(TNM) 병기가 일치하는 미세혈관침습이 없는(non-microvascular invasion, non-MVI) 40개의 암조직 시료를 선택하였다. 종양은 World Health

Organization의 병리 조직학적 분류기준에 근거하여 분류하였다. 두 질환 모두 모든 환자의 동의서를 받았고, 실험 프로토콜은 1975 헬싱키 선언의 윤리 가이드라인을 준수하였으며 각각 hospital clinic of barcelona의 윤리위원회 승인과 서울아산병원IRB 승인(#2012-0133)을 획득하였다.

II-3. 병리 동물모델

알코올성 간질환 동물모델은 마우스에 정상식이 또는 5% (vol/vol) 알코올 함유식이(Lieber-DeCarli diet, 총 열량의 36%가 알코올로부터 제공)를 총 4-6주 동안 먹이거나, 음용수 혹은 5g/kg body weight의 알코올을 음용수에 희석하여(binge alcohol diet) 하루에 두 번 7일 동안 먹였다. 후자의 경우 식이 섭취와 음용수는 자유롭게 접근할 수 있게 하였다. 간세포암 환자에서 기인한 간암 이종이식은 NOD/SCID 마우스에 세 명의 간세포암 환자로부터 얻은 간세포암 적출물(약 200 μ l)을 경피주입하였다(1세대). 종양 부피는 일주일에 2회 측정하였고 종양이 1cm³ 크기로 성장하면 BALB/c-누드 마우스에 계대이식하였다(2세대). 종양의 성장 속도 및 H&E 염색을 통하여 계대이식에 따른 간암세포의 특성 유지를 확인하였다 (IRB 승인번호: #NCCNCS-12-593, SNUIRB-E1401/001-003).

II-4. 세포배양

마우스 유래 정상 간세포주인 AML12, 인간 간암세포주인 HepG2 와 인간 배아 신장세포주 HEK293는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Hep3B, SK-Hep1, SNU886, SNU423, SNU475, SNU398, SNU878, SNU449, Huh7, PLC 간암세포주들은 한국세포주

은행 (KCLB, Seoul, South Korea)에서 구입하였다. 마우스로부터 얻은 일차 간세포는 기존에 확립된 방법에 의해 분리하였다 (Goodnough *et al.*, 2012). 모든 세포주 및 일차 간세포는 5% CO₂가 공급되는 37°C 의 배양기에서 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin 및 50 µg/ml streptomycin 을 함유한 각각의 배지에서 계대 배양하여 실험에 사용하였다. Huh7은 RPMI 배지를, AML-12 세포주는 insulin-transferrin-selenium X와 dexamethasone (40 ng/mL; Sigma)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 배지를, 다른 세포주 및 일차 간세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium 배지를 사용하였다.

II-5. 마이크로RNA의 Realtime RT-PCR

TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세포 및 조직에서 추출한 총 RNA(1 µg)로 miScript Reverse Transcription kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 cDNA를 얻었다. 마이크로RNA 발현양은 miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany)를 이용해 제조사의 지시된 방법에 따라 ABI StepOne plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기계에서 측정하였고, 결과값은 U6의 상대적인 값으로 보정하였다. 증폭된 산물의 특이성은 melting curve 분석을 통하여 확인하였다. DNA 증폭에 사용된 primer는 다음과 같다. MiR-148a, 5'- TCAGTGCACTACAGAACTTTGT-3', miR-148b, 5'- TCAGTGCACTACAGAACTTTGT-3', U6 5'-AATTCGTGAAGCGTTCCATATT-3'. 알코올성 간염 환자의 샘플은 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France)로 제조사의 지시된 방법에 따라 정량하였다.

II-6. cDNA의 Realtime RT-PCR

TRIzol을 사용하여 세포 및 조직에서 추출한 총 RNA(1.5 µg)와 d(T)₁₆ primer 및 AMV 역전사효소를 사용하여 cDNA를 얻었다. 확보한 cDNA 및 SYBR green dye (Takara, Japan)를 사용하여 제조사의 지시된 방법에 따라 ABI StepOne plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기계에서 측정하였다. 결과값은 18sRNA 또는 β-actin 유전자의 상대적인 값으로 보정하였다. 또한 melting curve 분석을 통하여 증폭된 산물의 특이성을 확인하였다. 알코올성 간염 환자의 샘플은 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 cDNA를 얻고 Taqman Human Assays 프로토콜에 따라 Taqman probes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 를 사용하여 ABI 7900 HT cycler (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 기계에서 측정하였다. cDNA 증폭을 위해 실험에 사용한 프라이머(primer) 서열은 다음과 같다.

mouse β-actin, 5'- CTGAGAGGGAAATCGTGCGT -3' 그리고 5'- TGTGGCATAGAGGTCTTTA -3'; 18s RNA, 5'- GTAACCCGTTGAACCCCAT -3' 그리고 5'- CCATCCAATCGGTAGTAGCG -3'; mouse FoxO1, 5'- CTGGGTGTCAGGCTAAGAGT -3' 그리고 5'- GGGGTGAAGGGCATCTTT -3'; mouse TXNIP, 5'- TCAAGGGCCCCTGGGAACATC -3' 그리고 5'- GACACTGGTGCCATTAAGTCAG -3'; mouse pri mir-148a, 5'- CCTGCAGGACGAACTTCCA -3' 그리고 5'- AAAGGA AAGGTGCAACGACG -3'. Human GAPDH, 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC-3' 그리고 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-

3'; human β -actin, 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCTG-3' 그리고 5'-CAGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'; human E-cadherin, 5'-TGAAGGTGACAGAGCCTCTGGA-3' 그리고 5'-TGGGTGAATTCGGGCTTGTT-3'; human USP4, 5'-ACCATTGCAACCATCGAGAA-3' 그리고 5'-TTTTGACTGCAAGGTCTGCC-3'. Taqman probes는 다음과 같다. 18sRNA, Hs99999901_s1; human FoxO1; Hs01054576_m1; human TXNIP, Hs01006900_g1.

II-7. 조직학적 검사

- 1) 면역 조직화학적 염색: 간조직 검체를 10% neutral buffered formalin에 고정하여 제작한 파라핀 포매 조직을 4 μ m 두께로 박절하여 슬라이드에 표본을 부착하였고, TXNIP, Caspase-1, USP4 항체를 반응시켜 염색하였다.
- 2) 형광면역염색: 4% 파라포름알데히드탈파라핀으로 고정한 세포를 0.3% Triton X-100으로 permeabilization 시키고 TXNIP와 NLRP3 항체로 반응시켰다. Fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG와 Alexa Fluor 568-conjugated anti-mouse IgG (1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA)를 2차 항체로 반응시켜 형광표지 한 후 hoechst 33342 NucBlue® Live ReadyProbes™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 포함된 봉입물질을 넣고 덮개유리로 밀봉하였다.

II-8. 생물정보학적 분석

알코올성 간염 환자의 유전자 발현은 Gene Expression Omnibus (GSE28619)을 이용하여 분석하였다. 유클리드 거리 측정 (K=4)으로 K 평균 군집 분석을 하였으며 가장 감소하는 1개 군의 유전자들을

도출하였다. Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID 6.7; <http://david.avcc.ncifcrf.gov/ref>) 온라인 생물정보학적 도구를 사용하여 gene ontology 분석을 수행하고 ‘세포 죽음’ 및 ‘전사 조절’에 공통적으로 관여하는 유전자를 대상으로 STRING v9.1 데이터베이스를 사용하여 네트워크를 도출하였다. MiR-148a의 유전자 타겟들은 TargetScan 알고리즘을 통해 예측하였고, gene ontology 분석 수행 후 ‘세포이동’에 관여하는 유전자를 네트워크화 하고 Cytoscape 소프트웨어로 도식화하였다.

II-9. 면역화학적 분석 (Immunoblot analysis)

세포 추출액에서 얻은 동량의 단백질을 sodium dodecylsulfate-polyacrylamide 젤 전기영동법(SDS-PAGE)으로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 단백질을 전이시켰다. 5% 탈지유 용액에 1시간 반응시킨 후 1차 항체로 반응시켰다. 그 후 2차 항체로 HRP-conjugated IgG를 1시간 반응시키고 ECL chemiluminescence system (GE Healthcare)를 사용하여 발색하였다.

II-10. 세포 분획법

전세포 추출액 (whole cell lysate)은 기확립된 방법에 따라 분리하였다 (Hwahng *et al.*, 2009). Bradford assay 실험법에 따라 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)의 단백질 정량 kit를 사용하여 단백질의 농도를 정량하였다.

II-11. 형질도입 (Transfection)

FoxO1 과발현 플라스미드는 Addgene (Cambridge, MA, USA)에서

공급받았고, Myc-DDK-tagged-USP4 과발현 플라스미드는 Origene (Rockville, MD, USA)에서 구매하였다. 세포 배양 용기 (6 well plate)의 50-70% 정도 배양된 세포에 FuGENE HD (Promega) 또는 Amaxa Nucleofection system (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 과발현 플라스미드 (1 µg) 또는 과발현 플라스미드의 backbone 만을 가지는 플라스미드 (Mock-transfection)를 세포 내로 도입하였다. USP4를 과발현하는 Stable cell 제작을 위해서 트랜스펙션 된 세포는 500 µg /ml의 G418 (geneticin; Life Technologies, USA)을 이용하여 선별하였다. 구축된 세포주는 1개월 이상 선별하였다. FoxO1과 TXNIP을 억제하기 위해 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매한 각 siRNA와 대조군 siRNA를 사용하여 형질도입하여 분석하였다. GenePharma (China)에서 구입한 miR-148a의 유사체 및 2'-O-메틸화 저해제와 각각의 대조 유사체 및 저해제를 세포에 일시적으로 도입하였다.

II-12. 리포터 유전자 분석 (Reporter gene assay)

MIR148A 유전자의 promoter 영역 -1,800 bp 에서 +1,097 bp를 포함하는 리포터 유전자인 pGL3-FoxO1 response element(RE) 및 FoxO1의 RE중 RE3의 서열을 변형한 mutant FoxO1 RE3 플라스미드를 제작하였다. FuGENE HD를 사용하여 리포터 유전자를 도입하였다. 형질도입 효율을 보정하기 위하여 pCMV-LacZ (20:1 비율) 플라스미드를 동시에 도입하였다. 세포는 passive lysis buffer 를 이용하여 용해시켰고, 세포 추출액 중의 firefly luciferase 활성을 측정하기 위하여 Luciferase Assay Reagent II (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. Firefly luciferase 활성은 β-galactosidase 활성으로 보정하여 상대적인 활성값을 구하였다.

II-13. 3'UTR 리포터 유전자 분석

Luc-TXNIP-3'UTR과 Luc-USP4-3'UTR을 포함하는 리포터 유전자를 GeneCopoeia (Rockville, MD, USA)에서 구매하였다. HEK293 세포 또는 AML-12 세포나 HepG2 세포에 FuGENE HD를 이용하여 리포터 유전자와 miR-148a 유사체(또는 저해제)를 같이 도입하였다. 48시간 후 Luc-Pair miR Luciferase Assay kit (GeneCopoeia)를 사용하여 활성을 측정하였다.

II-14. 염색질면역침전법 (Chromatin immunoprecipitation assays)

HepG2 세포에 FoxO1을 과발현 시킨 후 포름알데히드로 염색질과 cross-linking 시켰다. EZ-ChIP assay kit (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)를 사용하여 제공된 실험법에 따라 수행하였다. PCR은 *MIR-148A*의 유전자 프로모터에 FoxO1 결합 부위를 포함하는 프라이머를 사용하였고 그 서열은 다음과 같다. FoxO1-RE 1/2: sense, 5'-GGTTCGTCTGCTACCCAACA -3', antisense, 5'-GAGCCAGCCTGCTGATGTAA -3'; FoxO1-RE 3: sense, 5'-ACAACAGAACAGGCAGCAGA -3', antisense, 5'-CCCCATTTCCCCCTATGGAA -3', 유전자의 비 결합 영역(irrelevant region) 서열은 아래와 같다. sense, 5'-AAATTGATTCTACGTGCCCCG -3', antisense, 5'-GTCCCCTTCTTTTCCTTGG -3'.

II-15. 유세포측정법

Pyroptosis 분석을 위해 FAM-FLICA in vitro Caspase-1 Detection Kit (ImmunoChemistry Technologie, Bloomington, MN, USA)을 사용하여 제공된

방법에 따라 진행하였다. 형질도입한 세포를 trypsin처치로 떼어내고, 20% FBS를 첨가한 세포 배지에서 FAM-FLICA와 propidium iodide (PI)로 염색하였다. TXNIP와 FoxO1의 분석은 과발현한 세포를 trypsin 처치로 떼어낸 후, 0.3% Triton X-100이 함유된 TXNIP와 FoxO1 항체로 반응시켰다. Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG과 Alexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit IgG (1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 2차 항체로 사용하였다. 각 세포의 형광 강도는 FACS Calibur II flow cytometer와 CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

II-16. 면역침강법

TXNIP와 NLRP3의 결합을 관찰하기 위해 세포 균질액의 단백질 500 µg에 표적 단백질에 대한 항체 3 µg 을 넣고 4°C에서 12-18시간 반응시켰다. 항원-항체 결합체를 단백질 G 아가로오스 비드와 4°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 침전시키고 끓는 물에 5분간 반응시켰다. 추출된 단백질을 면역화학적 방법으로 관찰하였다.

II-17. 렌티바이러스 (lentivirus)를 이용한 세포선택적 유전자 전달

마우스의 miR-148a precursor sequence를 albumin 프로모터를 포함하는 플라스미드에 삽입한 후 lentivirus를 제작하였다. 마우스의 꼬리 정맥으로 대조군 또는 pre-miR-148a를 발현하는 렌티바이러스를 주입하였다 (마우스당 200 µL PBS주사액에 2×10^7 바이러스 포함). 바이러스 주입 7일 이후 정상식이 또는 5% (vol/vol) 알코올함유식이 (Lieber-DeCarli diet)를 총 4주간 시행하였다. 동물실험은 서울대학교 동물실험 윤리위원회 (Institutional Animal Use and Care Committee)의 지침에 따라 시행하였고

실험 프로토콜은 서울대학교 IBC의 승인을 획득하였다 (SNUIBC-R151119-1).

II-18. 체외 세포의 이동성 분석법

세포의 이동성 분석은 폴리카보네이트 필터로 된 24-well transwell unit (Corning Coster, Cambridge, MA)을 사용하여 수행하였다. 1.5×10^5 cells/ml 농도의 stable HepG2-WT, HepG2-USP4 세포 및 miR-148a 유사체나 저해제를 도입한 세포주를 type I 콜라겐(Collaborative Research, Lexington, KY)으로 필터 아래가 코팅된 상기 transwell plate의 상부에 위치시키고 세포를 14시간 동안 배양하였다. 메탄올을 사용하여 세포를 고정한 후, hematoxylin에 10분, eosin에 4분간 염색한 뒤, transwell 상층부에 이동하지 못한 세포들은 면봉으로 제거하였다. 현미경(x20배율)으로 관찰하여 필터의 하부로 이동한 세포의 수를 세어 이동성 표현형질을 결정하였다. 각 분석마다 8개 영역의 세포 수를 세었고, 각 시료는 세 번씩 동일한 실험을 반복하였다.

II-19. MTT 정량 분석법

Stable HepG2-WT, HepG2-USP4 세포주와 miR-148a 유사체가 도입된 세포주를 3시간 동안 혈청이 결여된 배지에서 배양한 후 1×10^4 cells/ml 농도의 세포로 48 well plate에서 24시간 동안 배양한 후 0.25 g/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)을 넣어 1시간 반응시켰다. MTT가 포함된 배양액을 버리고, dimethylsulfoxide를 0.2 mL/well씩을 넣어 MTT formazan을 용해한 후, 540nm의 흡광도에서 ELISA microplate reader (Tecan, Research Triangle Park, NC, USA)로 흡광도를

측정하였다.

II-20. 통계분석

면역화학적 분석에서는 단백질의 발현 밴드를 Image Scan and Analysis System (Alpha-Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA)을 사용하여 배경을 제외시킨 밴드 영역의 강도를 Adobe Photoshop CS5 software로 정량하였다. One way analysis of variance, unpaired 또는 paired Student's t-test로 그룹간 유의성을 평가하였다. 데이터는 산술평균 \pm SEM로 표기하였으며 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 을 기준으로 하였다. SPSS 프로그램을 이용하여 Spearman의 상관분석방법에 따라 상관계수 (r)을 구하였고 Kaplan-Meier 생존분석법으로 생존분석을 하였다. Mir-148a의 발현이 높거나 낮은 군의 차이는 카이제곱 검정(Chi-square test)으로 유의성을 평가하였고 기대빈도가 작은 군은 피셔(Fisher)의 정확한 검정을 사용하였다.

III. 연구 결과

1. 알코올에 의한 간세포 손상 모델에서 miR-148a의 발현 변화

알코올에 의한 간세포 손상 모델에서 마이크로RNAs의 변화를 알아보고자 알코올성 간염 환자의 간조직 마이크로RNA 마이크로어레이데이터(GSE59492)를 분석하였다. 건강한 사람의 간조직과 비교하여 알코올성 간염 환자의 간조직에서 가장 현저히 감소한 마이크로RNA는 miR-148a이었다 (Fig. 1A). qRT-PCR을 통해서 대조군에 비해 알코올성 간염 환자의 간조직에서 miR-148a의 발현이 유의적으로 감소함을 확인하였다 (Fig. 1B). MiR-148b의 발현은 유의미한 차이를 보이지 않았다. 자유롭게 또는 위장관으로 알코올을 투여하는 모델을 이용하여 알코올성 간질환의 이행을 연구하였다(Brandon-Warner *et al.*, 2012; Shukla *et al.*, 2013). 만성적으로 알코올을 섭취한 Lieber-DeCarli 동물 모델(Lieber-DeCarli liquid alcohol diet, 6주 투여)과 폭음 섭취군(binge alcohol drinking, 5 g/kg body weight, 주2회, 1주일동안 경구투여)에서도 miR-148a의 발현은 감소하였다 (Fig. 1C). Lieber-DeCarli 모델에서 알코올에 의한 간세포의 손상을 관찰할 수 있었고 (Fig. 1D upper), 이때 miR-148a의 발현은 혈청 ALT 및 TG의 농도 변화와 역상관성을 보였다 (Fig. 1D lower). 또한 알코올에 의한 miR-148a의 발현 감소는 마우스에서 분리한 간세포 및 AML-12세포에서도 관찰되었다 (Fig. 1E). 이러한 결과는 miR-148a의 발현이 알코올에 의한 간손상 모델에서 중요한 역할을 할 것이라는 것을 시사한다.

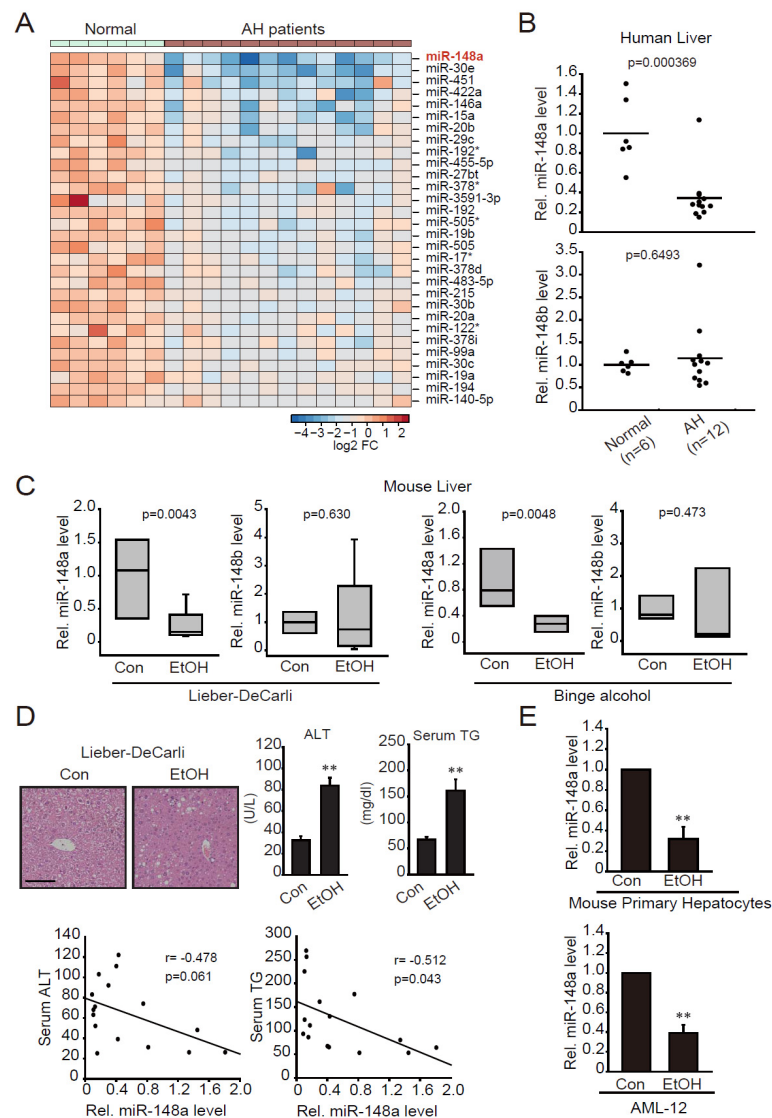


Figure 1. Dysregulation of miR-148a in AH patients or ALD animal models

(A) Heatmap of the significantly down-regulated miRNAs in AH patients (n=13) as compared to normal controls (n=6) (GSE59492) (log2 fold change <-1, p<0.01).

(B) qRT-PCR assays for miR-148a and miR-148b in AH patient or normal control

liver (n=6 or 12 each). Each point represents one sample, and the horizontal line does the mean value.

(C) qRT-PCR assays for miR-148a in mouse liver samples. Mice were fed on either control diet or Lieber-DeCarli alcohol liquid diet for 6 weeks (n=6 or 10 each), or received oral gavage of 5 g/kg alcohol twice a day for 7 days (n=7 each). Data were shown as box and whisker plot. Box, interquartile range (IQR); whiskers, 5–95 percentiles; and horizontal line within box, median. Con, control diet; EtOH, alcohol-containing diet.

(D) Liver histopathology (H&E, scale bar, 50 μ m), blood biochemical parameters and correlations between miR-148a levels and serum ALT activities (or TG contents) using the same samples from the Lieber-DeCarli mouse model. Data represented the mean \pm SEM (n=6 or 10 each, **p<0.01).

(E) qRT-PCR assays for miR-148a in hepatocytes. Mouse primary hepatocytes or AML-12 cells were exposed to 100 mM ethanol for 48 h. Data represented the mean \pm SEM (n=3 each, **p<0.01). Con, control; EtOH, ethanol treatment

2. 알코올에 의한 간세포 손상 모델에서 FoxO1의 발현 변화

알코올에 의한 간손상시 miR-148a의 발현 감소와 관련된 분자 기전을 탐구하고자 알코올성간염 환자의 간조직 cDNA 마이크로어레이 데이터(GSE28619)를 분석하였다. K 평균 군집 알고리즘(K=4)을 사용하여 알코올성 간염 환자에서 감소한 유전자군을 추출하였다. 그 중 가장 감소한 1개군의 약 3,310개의 유전자들을 DAVID 데이터베이스로 gene ontology 분석을 하여 ‘세포 죽음 억제 조절’과 ‘전사 조절’에 관여하는 유전자를 찾았다. STRING 데이터베이스를 이용하여 2가지 신호 경로에 공통적으로 관여하는 유전자들의 상호관계 분석하였고, FoxO1이 두 경로에 관여하는 유전자들의 핵심 유전자로 도출되었다 (Fig. 2A) qPCR-PCR로 알코올성 간염 환자에서 FoxO1 mRNA 발현 감소를 관찰하였다 (Fig. 2B). 폭음 섭취군의 동물에서도 동일한 결과를 얻었다 (Fig. 2C). 또한 Lieber-DeCarli 동물 모델과 폭음 섭취군에서 FoxO1의 단백질 발현이 감소함을 확인하였다 (Fig. 2D). 이상의 결과는 전사인자인 FoxO1의 발현 감소가 알코올에 의한 간세포 손상을 수반하는 여러 병리현상과 연관될 수 있음을 시사한다.

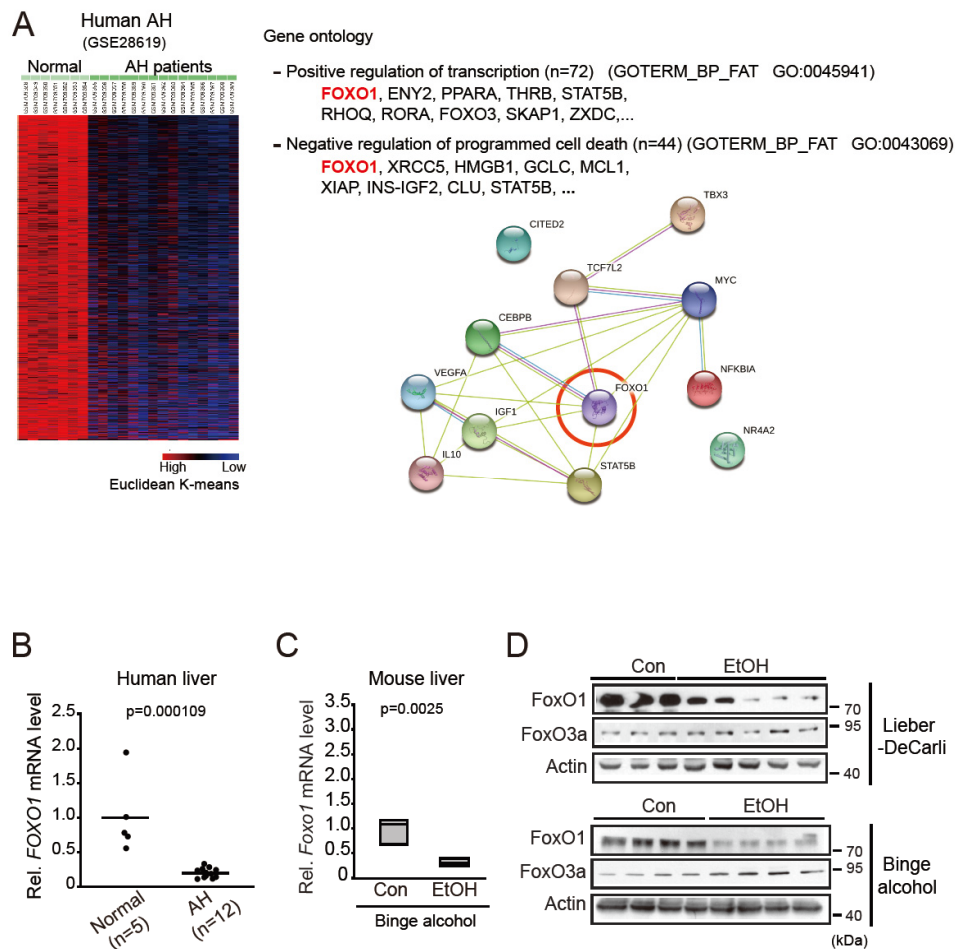


Figure 2. Inhibition of FoxO1 in AH patients or ALD animal models

(A) K-mean cluster and gene ontology analyses using the AH patient liver samples. FoxO1 was predicted as an inhibitor of alcohol-induced cell death among the most highly differentially expressed genes in GEO dataset (GSE28619). Blue, underexpression; and Red, overexpression (left). The genes were selected in the categories of two gene ontology pathways ($p < 0.05$) associated with transcriptional

regulation and programmed cell death (right).

(B) qRT-PCR assay for FOXO1 in the liver of AH patients (n=5 or 12 each). Each point represents one sample, and the horizontal line does the mean value.

(C) qRT-PCR assay for Foxo1 in the liver of mice subjected to binge alcohol drinking (n=7, each). Data were shown as box and whisker plot. Box, interquartile range (IQR); whiskers, 5–95 percentiles; and horizontal line within box, median.

(D) Immunoblottings for FoxO1 and FoxO3a in the livers from the Lieber-DeCarli or binge alcohol animal models.

3. FoxO1에 의한 전사적 miR-148a의 발현 조절

FoxO1의 발현 감소가 miR-148a의 발현 조절과 관계가 있는지 알아보고자 알코올성 간염 환자 및 알코올 투여 동물에서 FoxO1과 miR-148a의 상관성을 분석하였다. 알코올성 간염 환자 및 건강한 사람의 간조직에서 FoxO1과 miR-148a는 강한 상관성을 보였다 (Fig. 3A). 알코올을 섭취한 동물 모델에서도 유사한 상관성이 나타났다 (Fig. 3B). 이를 바탕으로 FoxO1이 miR-148a의 발현을 증가시키는지 알아보고자 FoxO1을 과발현하고 primary와 mature 형태의 miR-148a의 변화를 관찰하여 이들이 증가함을 관찰하였다 (Fig. 3C). MIR148A 유전자의 전사개시지점(transcription start site)은 보고되었다(Goedeke *et al.*, 2015). FoxO1이 miR-148a의 발현을 전사적으로 조절하는지 알아보기 위해 MIR148A의 프로모터 분석을 시행하였다. PROMO 분석에서 -3kb 길이의 MIR148A의 프로모터 부위에 FoxO1이 결합 가능 부위가 존재하였다 (Figure 3D, upper). ChIP 실험을 통해 FoxO1이 MIR148A의 프로모터 부위 중 프록시말 부분(proximal site-RE3)에 결합함을 확인하였다 (Figure 3D, middle). FoxO1의 특이적 결합은 유전자의 비결합영역을 타겟하는 비특이적 프라이머를 사용하여 PCR 실험을 수행한 결과를 통해서도 지지되었다 (Figure 3D, lower). 또한, FoxO1의 발현 저하에 의해 miR-148a의 유전자 프로모터의 활성이 감소하는 것을 확인하였다 (Fig. 3E). 하지만 FoxO1의 결합 부분 RE3의 mutant 프로모터를 삽입한 상태에서는 프로모터의 활성 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 FoxO1이 MIR148A를 전사적으로 조절할 수 있음을 제시한다.

transfected with Mock or FoxO1.

(D) ChIP assays for FoxO1 binding to the promoter regions of MIR148A. HepG2 cells were transfected with Mock or FoxO1 overexpression vector. DNA-protein complexes precipitated with anti-FoxO1 antibody were subjected to PCR amplifications using the primers flanking the indicated FoxO1-response elements (FoxO1-REs). IgG immunoprecipitation represents negative control. The specificity of FoxO1 binding was verified using the primers targeting an irrelevant region in the promoter. One tenth of cross-linked lysates served as the input control.

(E) MIR148A promoter reporter assays using FoxO1-RE 3 wild-type (WT) or mutant (Mut) luciferase constructs in HepG2 cells transfected with si Con or si FoxO1.

For C-E, data represented the mean \pm SEM (n= 3 each, *p<0.05, **p<0.01). n.s., not significant

4. 알코올에 의한 간세포 손상 모델에서 miR-148a에 의한 TXNIP 발현 조절

알코올에 의한 간세포 손상 모델에서 miR-148a의 변화에 따른 병리적 역할을 탐구하기 위해 miR-148a의 타겟유전자를 도출하고자 하였다. Lieber-DeCarli 모델에서 miR-148a의 발현과 혈청 ALT 및 TG의 농도는 역상관관계를 나타내었으므로, TargetScan으로 예측한 miR-148a의 잠재적 타겟 중 ‘계획적 세포 죽음’과 ‘지방/탄수화물 대사’ 신호 경로에 공통으로 관여하는 TXNIP에 주목하였다. (Fig. 4A). TXNIP는 다른 생물정보학 데이터베이스들(PicTar, miRanda, and DIANA)을 이용한 분석에도 miR-148a의 잠재적 타겟으로 예측되었다. 알코올성 간염 환자에서 TXNIP의 mRNA 발현은 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의미하지는 않았다 (Fig. 4B left). 하지만 miR-148a와 TXNIP의 mRNA 발현은 유의적으로 역상관관계를 나타내었다 (Fig. 4B right). 폭음 섭취모델에서 TXNIP의 mRNA 발현은 증가하였다 (Fig 4C). 이러한 효과는 Lieber-DeCarli 모델에서는 관찰할 수 없었다. 그러나 TXNIP의 단백 발현은 두 모델에서 모두 증가하였다. 또한 마우스에서 분리한 간세포 및 AML-12세포에서도 알코올 처치에 의한 TXNIP의 발현 증가를 확인하였으며 (Fig. 4D), 이는 간세포에서 알코올에 의한 직접적 효과로 TXNIP의 발현 변화가 나타남을 지지한다.

MiR-148a에 의한 TXNIP의 발현 변화를 관찰하기 위해, miR-148a의 유사체 또는 억제제를 도입하여 기능적인 분석을 시행하였다. MiR-148a 유사체를 도입하였을 때에는 TXNIP의 발현이 감소하였고, miR-148a 저해제를 도입하였을 경우 TXNIP의 발현은 증가하였다 (Fig. 4E). TXNIP mRNA의 3'untranslated region (UTR) 부위에 miR-148a가 결합할 것으로

추정되는 부위가 존재하였으므로 (Fig. 4F upper), miR-148a가 직접적으로 TXNIP의 발현을 억제하는지를 확인하고자 하였다. 예상대로 pEZXTXNIP-3'UTR luciferase construct를 이용하여 miR-148a 유사체를 도입한 결과 리포터의 활성이 감소하였고, miR-148a 저해제를 도입하였을 때는 반대의 결과를 나타내었다 (Fig. 4F lower). 알코올 처치에 의한 간세포 손상시에도 miR-148a가 TXNIP의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 1주일간 알코올을 섭취한 마우스의 간세포를 분리하고 거기에 miR-148a 유사체를 도입하였다. 그 결과 miR-148a 유사체 도입에 의해 TXNIP의 mRNA 및 단백 발현이 감소하였다 (Fig. 4G). FoxO1에 의한 TXNIP의 발현 저하 및 miR-148a 저해제를 통한 억제효과도 세포 실험으로 확인하였다. FoxO1을 과발현하였을 때에는 알코올 처리에 따른 TXNIP의 발현 증가가 저해되었으며, miR-148a 저해제를 도입하였을 때에는 그 효과가 약화되었다 (Fig. 4H). 8주간 알코올을 섭취한 마우스 간 조직의 cDNA 마이크로어레이 데이터(GSE67546)를 분석하였을 때에도, 알코올 섭취에 의해 FoxO1은 감소하고 TXNIP는 증가하였으며, FoxO1과 TXNIP는 음의 상관성을 보였다 (Fig. 4I).. 이러한 결과들은 간세포에서 알코올에 의한 FoxO1 매개 miR-148a의 발현 저하가 TXNIP 유도에 기여함을 제시한다.

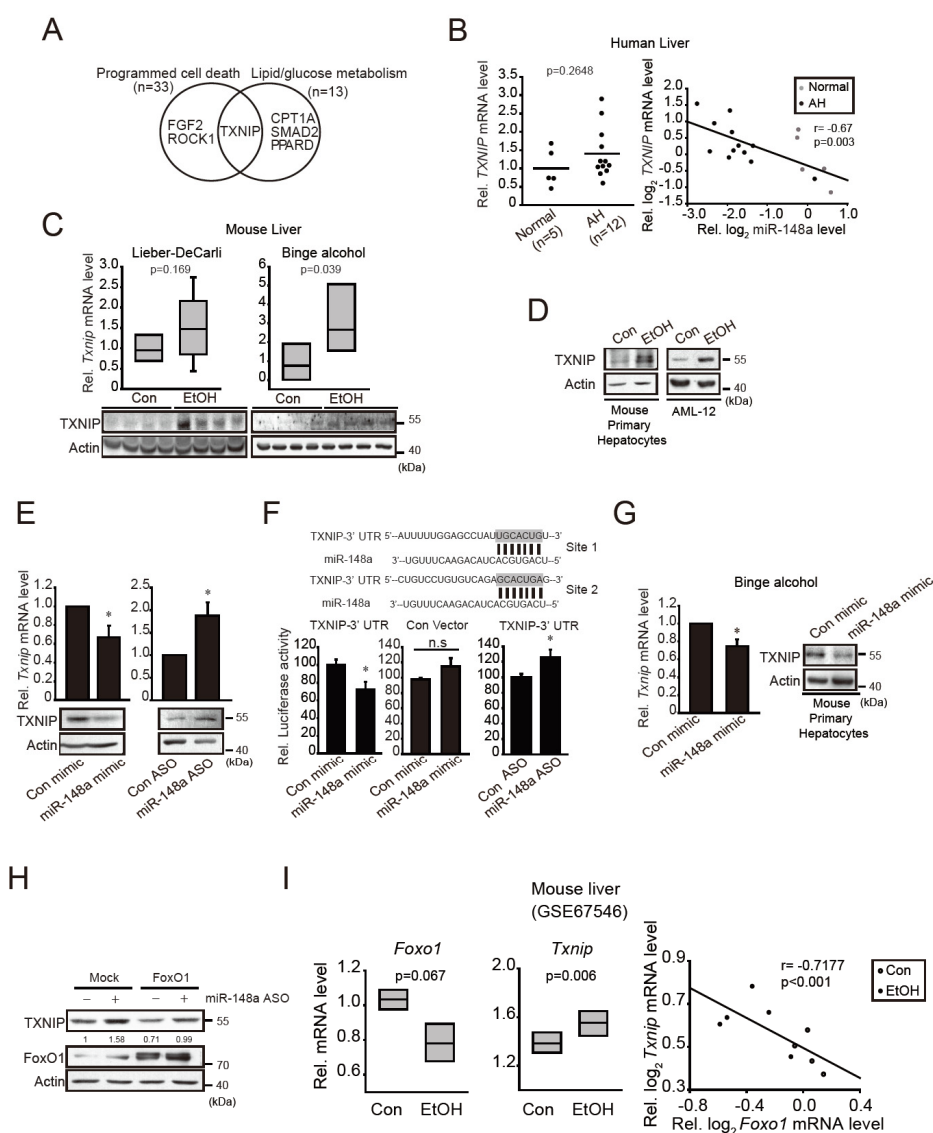


Figure 4. TXNIP overexpression as a result of miR-148a dysregulation by ethanol

(A) Gene ontology analysis of putative target genes of miR-148a using two selected gene ontology categories (programmed cell death and lipid/glucose metabolism pathways).

(B) qRT-PCR assays for TXNIP in AH patient liver samples (upper left). Each point represents one sample, and the horizontal line does the mean value. Correlations between miR-148a and TXNIP levels were analyzed (upper right). Immunohistochemistry for TXNIP in AH patient liver samples (lower).

(C) qRT-PCR or immunoblotting assays for TXNIP in the liver samples from Lieber-DeCarli (n=6 or 10 each) and binge alcohol (n=7 each) mouse models. Data were shown as box and whisker plot. Box, interquartile range (IQR); whiskers, 5–95 percentiles; and horizontal line within box, median.

(D) Immunoblotting for TXNIP in the lysates of mouse primary hepatocytes or AML-12 cells treated with 100 mM ethanol for 48 h.

(E) qRT-PCR or immunoblotting assays for TXNIP in the lysates of AML-12 cells transfected with miR-148a mimic for 48 h (left) or miR-148a ASO for 72 h (right).

(F) TXNIP-3'UTR luciferase activity assays using HEK293 cells transfected with control mimic or miR-148a mimic, or HepG2 cells transfected with Con ASO or miR-148a ASO.

(G) qRT-PCR or immunoblotting assays for miR-148a-modulated mouse primary hepatocytes isolated from the mice treated with binge alcohol for 7 days.

(H) Immunoblotting assays for TXNIP in the lysates of AML-12 cells treated with ethanol for 48 h after transfection with FoxO1 (or Mock) and miR-148a ASO (or Con ASO). Values indicate intensities relative to Mock control.

(I) FoxO1 and TXNIP transcript levels in liver samples from Lieber-DeCarli diet mouse model (n=4 or 5 each) using cDNA array database (GSE67546). Data were shown as box and whisker plot. Box, interquartile range (IQR); whiskers, 5–95 percentiles; and horizontal line within box, median. Correlation analyses were done

using the same database.

For E-G, data represented the mean \pm SEM (n=3 or 4 each, *p<0.05). n.s., not significant

5. TXNIP 의존적 inflammasome에 의한 간세포의 pyroptosis

Inflammasome의 활성화는 다양한 간질환의 진행에 관여한다(Szabo *et al.*, 2012). TXNIP는 NLRP3에 결합하여 NLRP3 inflammasome을 활성화시키므로(Zhou *et al.*, 2010), 알코올에 의한 간세포 손상에서 TXNIP 매개 NLRP3 inflammasome의 역할을 탐구하고자 하였다. 알코올성 간염 마우스 간 조직의 RNA시퀀싱데이터 (GSE97234)를 분석하였을 때, inflammasome 유전자인 NLRP3, ASC, IL-1 β 의 발현이 증가하였다 (Fig. 5A). 마우스에서 분리한 간세포 또는 AML-12 세포에 알코올을 처리한 샘플에서 NLRP3의 mRNA 및 단백 발현 증가를 관찰하였다 (Fig. 5B). 알코올 처리에 의해 활성형의 caspase-1과 ASC의 단백발현도 증가하였다. 면역염색을 통해 알코올을 처리한 세포에서 TXNIP와 NLRP3가 같은 위치에서 염색됨을 알 수 있었다 (Fig. 5C). 또한 염색질 면역침강법에서 알코올에 의해 TXNIP와 NLRP3의 결합이 증가함을 관찰하였고, 이러한 결과는 miR-148a의 유사체 도입에 의해 저해되었다 (Fig. 5D left). TXNIP의 발현을 저해하였을 때에도 활성형의 caspase-1 발현이 감소하였으나 NLRP3의 발현에는 영향을 주지 않았다 (Fig. 5D right). 나아가, 알코올 처리에 의해 같은 위치에 염색된 TXNIP와 NLRP3의 발현이 miR-148a 유사체 도입에 의해 감소함을 관찰하였다. (Fig. 5E)

Caspase-1은 계획된 세포의 죽음인 pyroptosis를 유도하므로(Wree *et al.*, 2014), 알코올에 따른 간세포 손상시 pyroptosis가 일어나는지를 알아보려고 하였다. Pyroptosis의 표지자인 활성형의 caspase-1과 PI로 이중형광염색 후 유세포 분석을 한 결과, 알코올 처치에 의해 caspase-1과 PI 모두 양성인 세포수가 증가하였다 (Fig. 5F). 이러한 결과는 miR-148a 유사체 도입에 의해 약화되었다. 유사하게, TXNIP의 발현을

억제하였을 때에도 알코올에 의해 증가된 이중 형광염색세포수가 감소하였다. 이상의 결과는 알코올에 의한 간세포의 손상시 inflammasome이 활성화되고 pyroptosis가 촉진됨을 지지한다.

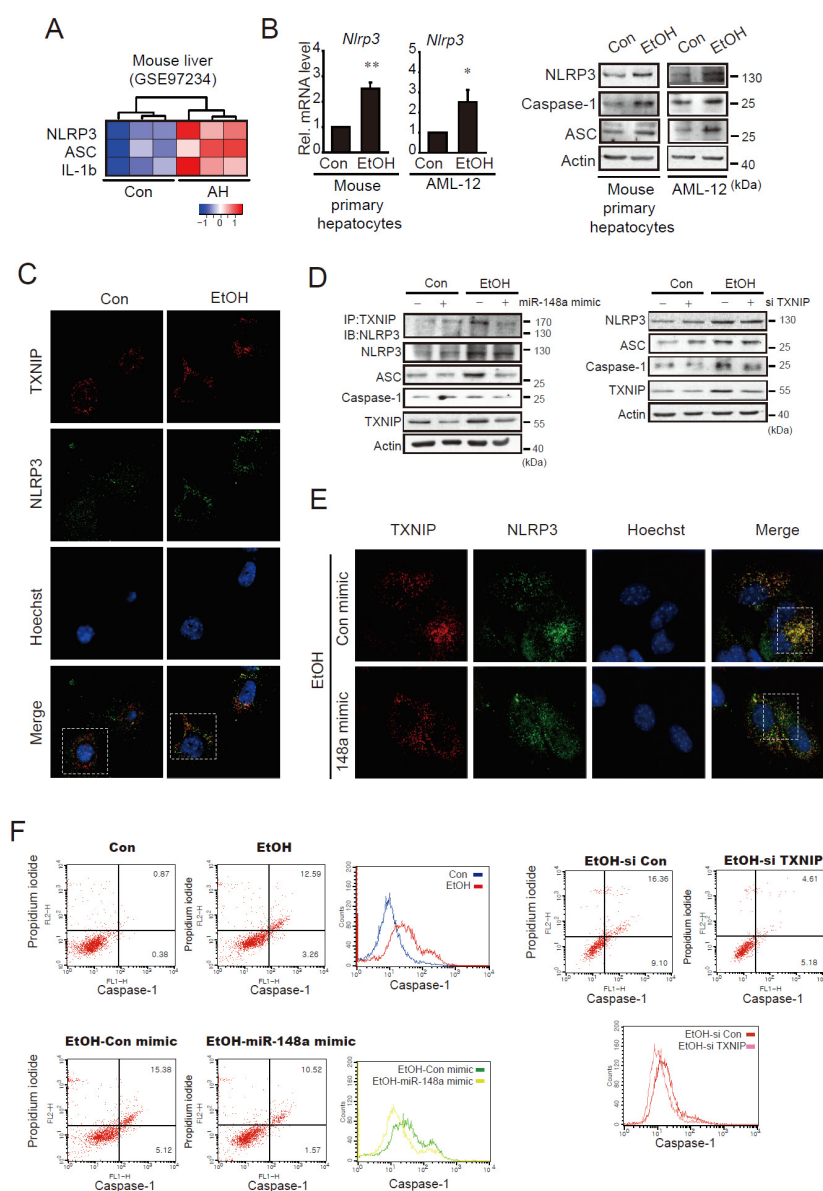


Figure 5. Pyroptosis of hepatocytes as mediated by TXNIP-dependent inflammasome activation

- (A) Heatmap of the inflammasome genes in liver tissues with AH mice as compared to normal controls (n=3 each) (GSE97234)
- (B) qRT-PCR or immunoblotting assays for NLRP3 and other inflammasome markers in mouse primary hepatocytes or AML-12 cells treated with 100 mM ethanol for 48 h. Data represented the mean \pm SEM (n=4 each, *p<0.05, **p<0.01).
- (C) Confocal images of TXNIP and NLRP3 in AML-12 cells treated with 100 mM ethanol for 48 h.
- (D) Immunoprecipitation or immunoblottings for TXNIP and NLRP3 inflammasome markers in AML-12 cells exposed to 100 mM ethanol for 48 h immediately after transfection with miR-148a mimic (or Con mimic) (left) or TXNIP siRNA (or Con siRNA) (right).
- (E) Confocal images of TXNIP and NLRP3 in AML-12 cells treated with 100 mM ethanol for 48 h immediately after transfection with miR-148a mimic (or Con mimic).
- (F) Flow cytometric analyses using propidium iodide (PI) and active caspase-1 markers. AML-12 cells were similarly transfected, and then treated with 200 mM ethanol for 48 h. miR-148a mimic and TXNIP knockdown experiments were separately done.

6. 알코올에 의해 손상된 간세포에서의 inflammasome 활성화

알코올에 의한 간세포 손상시 inflammasome의 활성화가 간세포 내에서도 나타나는지 알아보기 위해, clodronate 리포솜을 이용하여 매크로파지(macrophage)를 고갈시킨 뒤 알코올 처치에 따른 inflammasome 활성화를 관찰하였다. Clodronate 리포솜 처치에 의한 매크로파지의 억제에는 F4/80 발현으로 확인하였다. Lieber-DeCarli 알코올 섭취를 5주간 시행한 동물 모델의 간조직에서는 F4/80의 발현이 증가했으나, clodronate 리포솜을 처치한 군에서는 이러한 증가가 관찰되지 않았다 (Fig. 6A). Clodronate 처치는 간세포의 조직학적 변화를 유도하지 않았고, 알코올에 의한 간손상을 심화시키지 않았다 (Fig. 6B). TXNIP, active caspase-1, 그리고 ASC의 발현은 알코올 섭취 군과 clodronate 처치 후 알코올 섭취군 모두에서 증가하였다 (Fig. 6C). 하지만 NLRP3와 IL-1 β 의 발현은 알코올 섭취 군과 비교하여 clodronate 처치 후 알코올 섭취 군에서 감소하였다. FoxO1의 발현은 두 군에서 차이가 없었다. 또한 clodronate 처치는 혈청 ALT와 AST의 농도에도 영향을 주지 않았다 (Fig. 6D). 면역조직화학적 염색에서도 TXNIP와 caspase-1의 발현은 clodronate처리와 관계없이 알코올을 섭취에 의해 증가하였다. (Fig. 6E). 이상의 결과는 알코올이 간세포 내에서도 inflammasome을 활성화시켜 간세포 손상에 기여할 것임을 시사한다.

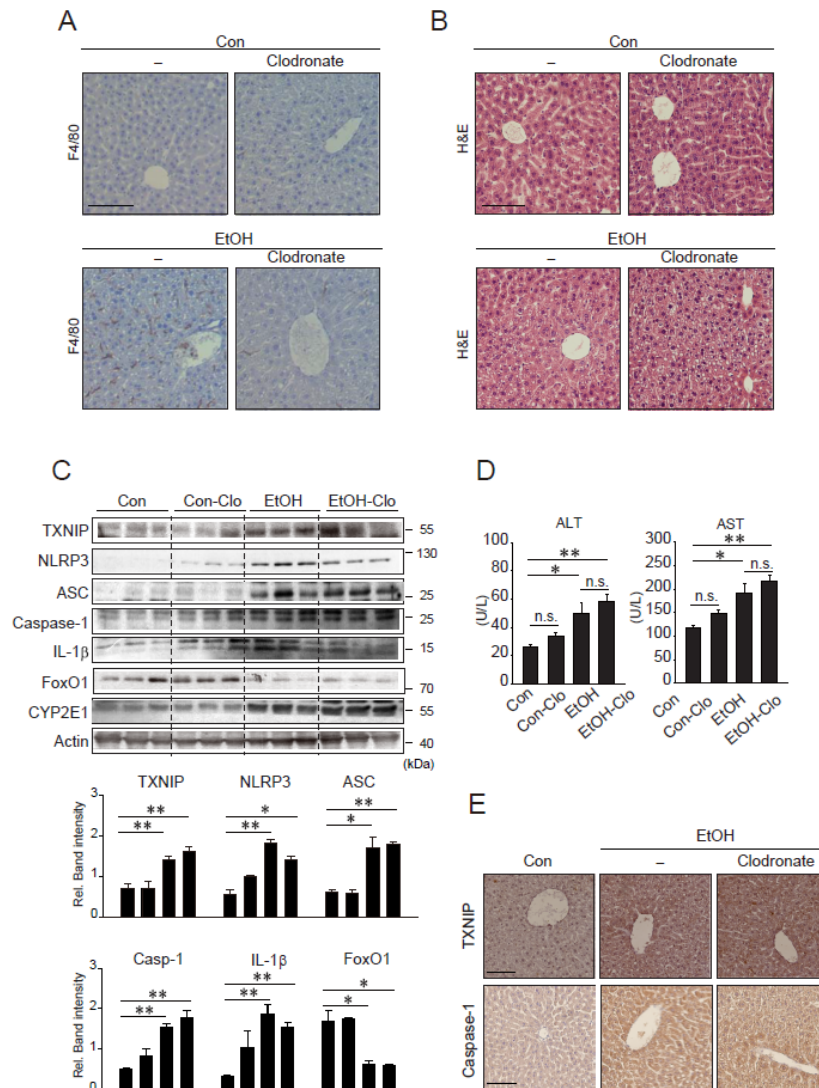


Figure 6. Ethanol-induced inflammasome activation in hepatocytes of mice treated with clodronate

(A, B) Representative immunohistochemistry for F4/80 (scale bar, 100 μ m), and H&E staining (scale bar, 50 μ m). C57BL/6 mice were first intravenously injected

with 10 mL/kg body weight of clodronate (or vehicle), and after a week, they were subjected to Lieber-DeCarli alcohol liquid diet (or control diet) with additional injections of clodronate (5 mL/kg body weight, i.p., every 4 days) for 5 weeks.

(C) Immunoblottings for TXNIP, inflammasome or other biomarkers.

(D) ALT and AST activities. (n=3-6 each)

(E) Immunohistochemistry for TXNIP or caspase-1. Representative liver sections were shown (n=3, each). Scale bar, 100 μ m

For C and D, data represent the mean \pm SEM (statistical comparisons among groups by one-way ANOVA with Fisher's Least Significant Difference (C) or Bonferroni correction (D) for multiple comparisons, * p <0.05, ** p <0.01). n.s., not significant

7. 간세포 선택적 miR-148a 발현에 의한 간세포 손상 억제

알코올성 간질환에서 miR-148a의 변화에 따른 치료 효과를 관찰하기 위해, albumin 프로모터 뒤에 miR-148a를 발현할 수 있는 유전자를 삽입한 렌티바이러스 벡터를 제작하고 이를 통해 렌티바이러스를 합성하였다. 간세포 선택적으로 miR-148a의 발현을 유도했을때, Lieber-DeCarli 알코올 4주 섭취에 의한 간세포 손상 및 지질 축적이 개선되었다 (Fig. 7A left). MiR-148a가 간세포에 잘 전달되었음을 간조직의 miR-148a 발현을 관찰하여 증명하였다 (Fig. 7A right). 알코올 섭취에 의해 증가한 TXNIP, ASC, caspase-1, 그리고 IL-1 β 의 발현이 miR-148a의 과발현에 의해 감소하였다 (Fig. 7B). 또한 알코올에 의한 FoxO1의 발현 감소도 miR-148a 과발현에 의해 약화되었으나 NLRP3와 CYP2E1의 발현은 변화되지 않았다. 면역조직화학적 염색에서도 알코올에 의해 증가된 TXNIP와 caspase-1의 발현이 miR-148a의 과발현에 의해 감소하였다 (Fig. 7C). 나아가 알코올 처리에 따라 증가한 체중 대비 간 무게 비율, 혈청 ALT 농도, 혈청 및 간 내 TG 농도 모두 miR-148a 과발현에 의해 개선되었다 (Fig. 7D). 상기 결과를 종합해 볼 때, miR-148a는 TXNIP의 발현을 저해함으로써 알코올에 의한 간세포 내 inflammasome의 활성화 및 간세포의 pyroptosis를 억제한다

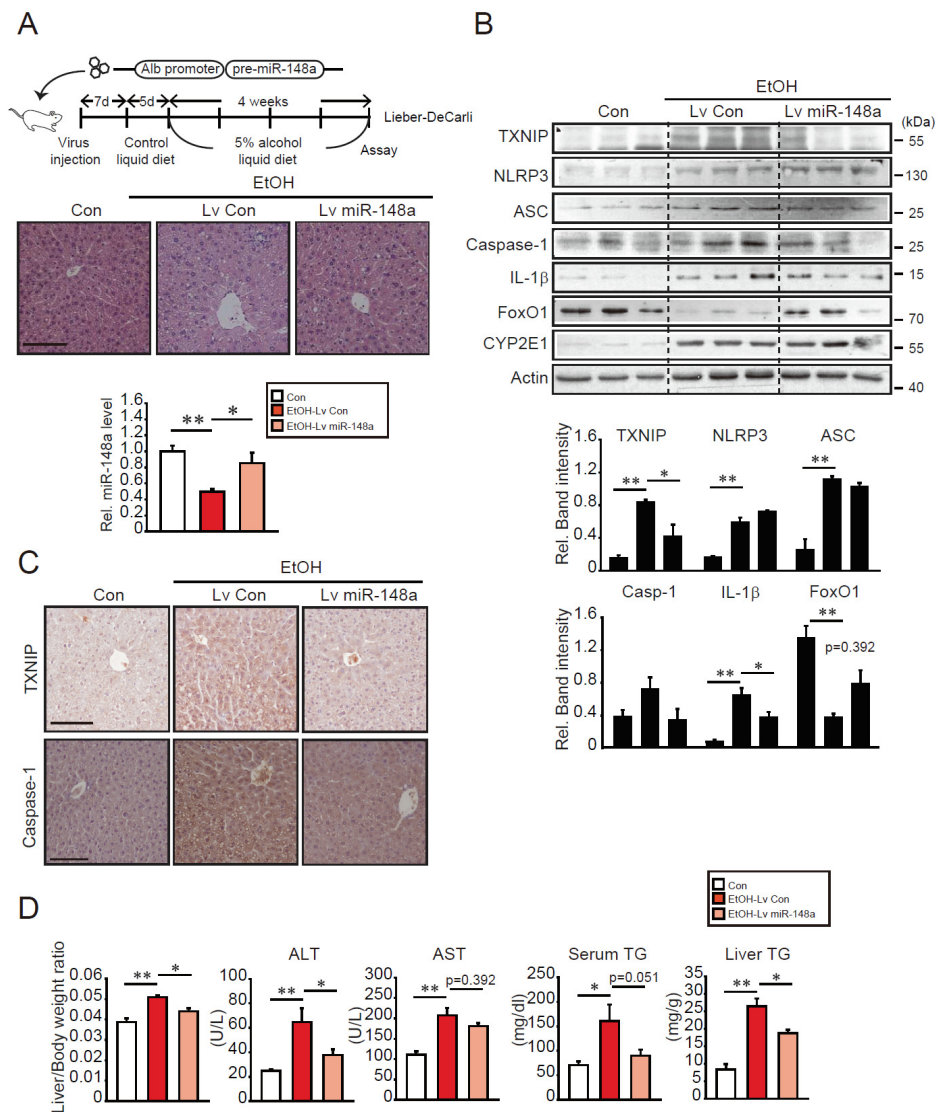


Figure 7. Inhibition of inflammasome and liver injury after hepatocyte-specific lentiviral delivery of miR-148a

(A) H&E staining (scale bar, 50 μ m) and qRT-PCR assays for miR-148a in the liver. Mice were intravenously injected with a single dose of albumin promoter-pre-miR-

148a lentiviruses (or control), and after a week, they were fed on a Lieber-DeCarli diet for 4 weeks as depicted in the scheme. (n=4-6, each group)

(B) Immunoblotting assays for TXNIP, inflammasome or other biomarkers in liver homogenates.

(C) Immunohistochemistry for TXNIP or caspase-1. Representative liver sections were shown (n=3, each). Scale bar, 100 μ m

(D) Liver-to-body weight ratio and representative blood biochemical parameters.

For A, B, and D, data represent the mean \pm SEM. Significantly different as compared to each control, *p<0.05, **p<0.01. For, A, statistical significance of differences between two groups indicated (unpaired t-test). For B and D, statistical comparisons among groups by one-way ANOVA with Fisher's Least Significant Difference (B) or Bonferroni correction (D) for multiple comparisons.

8. MiR-148a 변화에 따른 간세포암의 진행

간세포암에서 miR-148a의 변화를 알아보기 위해 간세포암 환자의 시료에서 miR-148a의 발현을 분석하였다. 주변 정상조직(non-tumorous tissue, NT)에 비해 간세포암 시료에서 miR-148a의 발현이 감소함을 관찰하였다 (Fig. 8A). 또한 미세혈관 침습이 없는 간세포암 시료에 비해 미세혈관 침습이 있는 간세포암 시료 및 TNM 병기가 높은 간세포암 시료에서 miR-148a의 발현이 더 감소함을 확인하였다. 간세포암 시료에서 miR-148a의 중앙값(median)을 기준으로 miR-148a의 발현이 높은 군과 낮은 군으로 분류한 뒤, Kaplan-Meier 생존분석법에 따라 생존율을 분석하였다. 흥미롭게도 miR-148a의 발현이 낮은 그룹에서 전체 생존율(overall survival rate)이 현저히 낮았다 (Fig. 8B, left). 뿐만 아니라, miR-148a의 발현이 낮은 그룹에서 무재발생존율(recurrence free survival rate)도 낮았다 (Fig. 1B, right). 나아가, miR-148a의 발현 정도에 따라 TNM 병기 및 α -fetoprotein의 발현도 유의적으로 차이를 보였다 (Table 1).

간세포암의 악성화에 관여하는 miR-148a의 하위신호를 알아보기 위해 전이와 관련한 miR-148a의 잠재적 타겟을 분석한 결과, 16개의 유전자가 ‘세포 이동’에 관여하였다. 이 유전자들의 상호 관계를 STRING 데이터베이스로 분석하였고, UBC, FGF2, 그리고 TGFBR1가 파트너 유전자와 가장 큰 상호 관계를 가지는 ‘핵심 유전자’로 나타났다. 이 중 UBC와 TGFBR1을 연결할 수 있는 유전자로 USP4가 예측되었다 (Fig. 8C). USP4 mRNA의 3'UTR 부분에 miR-148a가 결합할 수 있는 영역이 존재하였다 (Fig. 8D). 따라서, 간세포암의 진행과 관련하여 USP4를 miR-148a의 잠재적 타겟으로 주목하였다. 면역화학적 분석 결과, USP4의

발현은 주변 정상조직에 비해 간세포암 시료에서 높았다 (Figure 8E). 특히, 59명의 간세포암 환자 중 18명(31%)에서는 그 발현이 2배이상 증가하였다. 면역조직화학적 염색에서도 USP4의 단백 발현이 주변 정상조직에 비해 간세포암 시료에서 높았다 (Fig. 8F). 또한 USP4와 miR-148a는 음의 상관성을 보였다 (Fig. 8G). 이러한 결과는 miR-148a 발현 저하에 따라 간세포암 환자의 생존율이 낮아지고 간세포암 환자의 예후가 나빠짐을 보여준다.

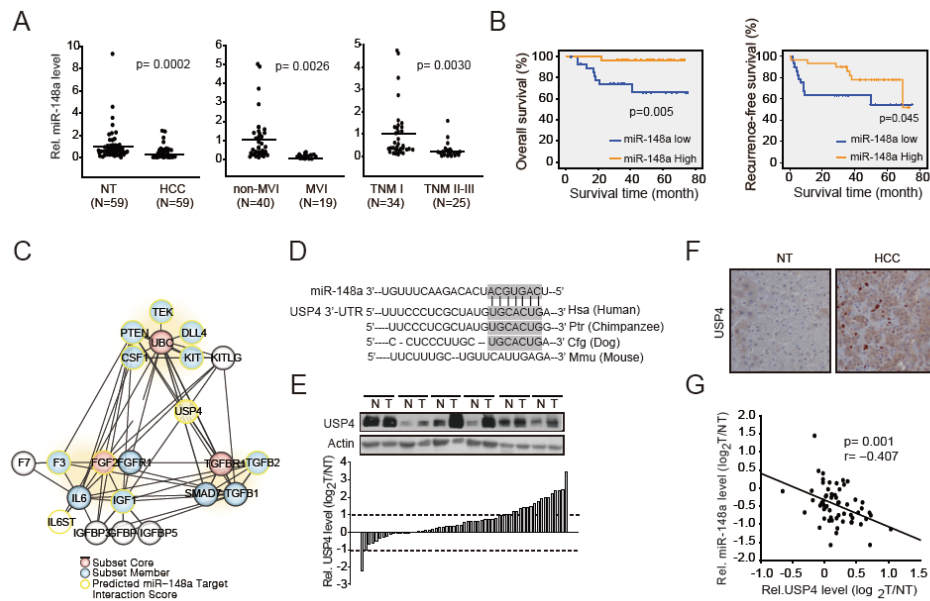


Figure 8. Survival and MVI rates of HCC patients in association with miR-148a dysregulation

(A) qRT-PCR assays for miR-148a in HCC versus NT (left), or HCC with MVI versus non-MVI (right). The line indicates the mean. Statistical analysis was done by Student's t-test.

(B) The overall survival rates and recurrence free survival rates of HCC patients with high or low miR-148a expression.

(C) A gene interaction network. Filled colors indicate subset core (red) and member (blue), whereas border colors do predicted targets of miR-148a (yellow). Line thickness represents interaction text-mining score measured using STRING database (left).

(D) A sequence of miR-148a and its binding sites within the 3'-UTR regions of USP4

(E) Immunoblottings for USP4. Protein levels were measured in 59 pairs of primary HCCs (T) and their adjacent NTs (N). A log₂ fold change more than 1 or less than -1 was considered overexpression or suppression.

(F) Immunohistochemical analyses for USP4. Shown above are the representative figures (×200).

(G) The correlation between miR-148a and USP4, as determined by Pearson analyses.

Table 1. Correlation between miR-148a levels and clinico-pathological characteristics in human primary HCC specimens

	miR-148a expression		p-value
	low (n=30)	high (n=29)	
Age			
Mean \pm SD	52.8 \pm 10.05	56.1 \pm 11.02	0.470 ¹
Gender			
Male	24	18	0.128 ²
Female	6	11	
Tumor size (cm)			
\leq 5	16	19	0.341 ²
>5	14	10	
Tumor stage*			
TNM I	10	24	<0.001 ^{**2}
TNM II-III	20	5	
Vascular invasion			
No	13	27	<0.001 ^{**3}
Yes	17	2	
Satellite nodule			
No	27	27	0.669 ³
Yes	3	2	
E-S grade (MC)			
I-II	20	24	0.156 ²
III- IV	10	5	
AFP (ng/ml)			
\leq 20	7	18	0.003 ^{**2}
>20	23	11	

*modified AJCC

** p<0.01, ¹Student's t- test, ²Chi-square test, ³Fisher's exact test

Abbreviation: AFP, α -fetoprotein; AJCC, American Joint Committee on Cancer;

9. 중간엽성 간암세포주에서 USP4의 발현 변화

간암세포는 상피성에서 중간엽성으로 형질이 변화되어 악성화되며 이때 전이능과 침윤성이 증가한다(Yang *et al.*, 2009). USP4의 발현 증가와 암세포의 악성화와의 연관성을 알아보기 위해, 11종의 간암세포주(HepG2, Huh7, PLC/PRF/5, Hep3B, SNU449, SNU886, SNU475, SNU423, SNU398, SNU878, SK-Hep1)를 상피성 간암세포주와 중간엽성 간암세포주로 나누고 USP4의 발현을 관찰하였다. 그 결과 상피성 간암세포주에 비해 중간엽성 간암세포주에서 USP4의 발현이 더 증가하였다 (Fig. 9A). USP4는 TGF- β 타입I 수용체(transforming growth factor- β receptor type I, T β RI)를 안정화시켜 TGF- β 신호의 활성화에 기여한다. 예상대로 USP4의 발현이 높은 중간엽성 간암세포에서 T β RI의 발현이 증가하였다. 또한 이들 중간엽성 간암세포주에서 USP4의 mRNA 발현도 높았다 (Fig. 9B). USP4와 상피성 표지자인 E-cadherin의 발현은 유의적인 역상관관계를 나타내었다 (Fig. 9C). 이상의 결과는 USP4가 중간엽성 간암세포주에서 더욱 증가함을 보여준다.

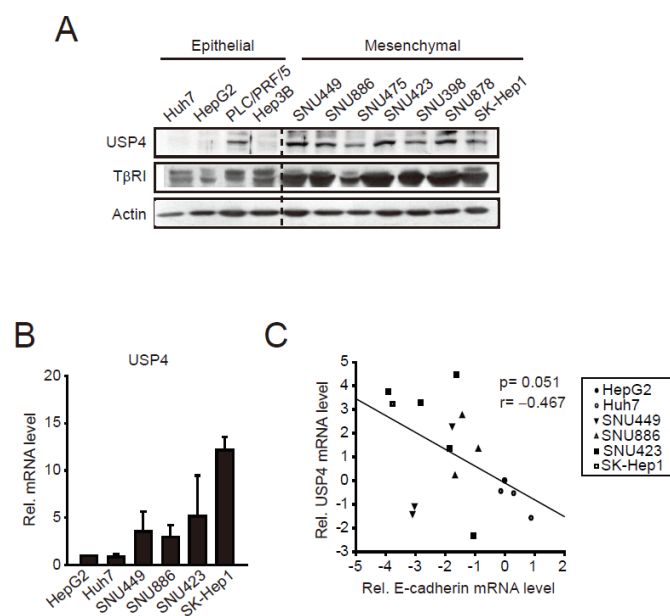


Figure 9. Comparisons of USP4 and E-cadherin levels in liver-tumor cell lines

(A) Immunoblottings for USP4 and TβRI.

(B) qRT-PCR assays for USP4. Data represented the mean \pm SEM of at least 3 separate experiments.

(C) Correlation analyses. The relative USP4 mRNA levels were plotted against those of E-cadherin (E-cadherin in HepG2=1). Actin was used as control.

10. MiR-148a에 의한 USP4의 발현 변화

MiR-148a와 USP4가 역상관관계임을 바탕으로 miR-148a가 USP4를 직접적으로 억제하는지를 확인하고자, miR-148a의 유사체 또는 억제제를 도입하여 USP4의 발현을 살폈다. USP4-3'UTR부위를 함유하는 p-EZX-USP4-3'UTR luciferase construct와 miR-148a의 유사체를 HEK293세포주에 도입하였을 때, 리포터의 활성이 감소하였다 (Fig. 10A). MiR-148a 저해제를 HepG2세포주에 도입하였을 때에는 리포터 활성이 증가하였다. 이러한 결과는 USP4가 miR-148a의 타겟임을 지지한다. Huh7과 HepG2세포주에 miR-148a 저해제를 도입하였을 때 USP4의 전사 발현이 증가하였고, 반대로 SK-Hep1세포주에 miR-148a 유사체를 도입하였을 때 USP4의 발현이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 10B). 또한 miR-148a의 변화에 따른 USP4와 TβRI의 단백질 발현에서도 같은 결과를 얻었다 (Fig. 10C). 이는 miR-148a가 USP4 mRNA의 안정화에 관여하여 발현을 증가시킴을 제시한다.

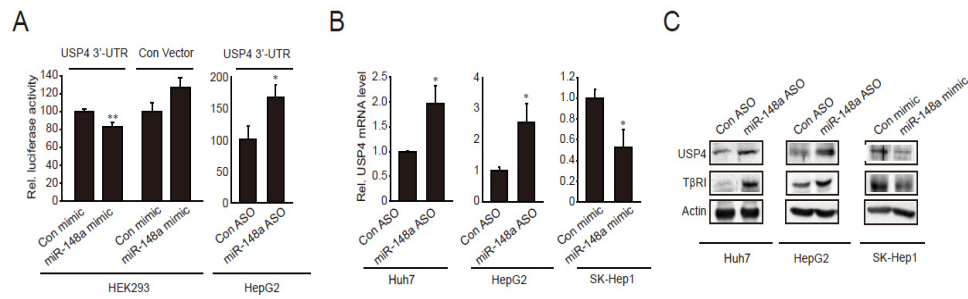


Figure 10. Inhibition of USP4 translation by miR-148a

(A) 3'UTR reporter assays. Indicated cells were transfected with control mimic (or ASO) or miR-148a mimic (or ASO) in combination with reporter construct.

(B) The effect of miR-148a ASO and miR-148a mimic on USP4 transcription.

(C) Immunoblottings for USP4 and TβRI in cells transfected with miR-148a ASO and miR-148a mimic.

For A and B, data represent the mean±SEM of at least 3 separate experiments (significantly different from transfection control, *p<0.05, **p<0.01).

11. USP4 의존적 TGF- β 신호 조절

TGF- β 신호는 암 세포의 증식, 부착, 전이를 촉진시킨다(Elliott *et al.*, 2005). USP4의 발현이 높은 세포주에서 TGF- β 에 의한 하위 신호 활성화가 나타나는지를 살펴보고자 하였다. HepG2세포주를 상피엽성의, SK-Hep1세포주를 중간엽성의 대표 세포주로 사용하였다. TGF- β 신호의 활성화는 T β RI 수용체를 경유하여 Smad2와 Smad3의 인산화를 유도한다(Zhang *et al.*, 2012). Smad2의 인산화를 TGF- β 신호 활성화의 척도로 사용하기 때문에 T β RI 수용체의 활성화를 p-Smad2로 평가하였다. 상피성 간암세포주인 HepG2보다 중간엽성 간암세포주인 SK-Hep1에서 Smad2의 인산화가 증가하였다 (Fig. 11A). 유사하게, USP4를 과발현한 HepG2세포주에서 인산화된 Smad2의 발현이 높게 나타났다. 또한 리간드인 TGF- β 를 처리하였을 때에도 USP4 과발현 HepG2세포주에서 인산화된 Smad2의 발현이 높았다. (Fig. 11B).

다음으로, TGF- β 신호 활성화에 따른 간세포암의 기능적 변화를 살펴보고자 하였다. 간세포암에서 miR-148a 및 USP4의 발현 변화가 암세포의 증식과 이동에 영향을 주는지 관찰한 결과, 예상대로 USP4가 과발현된 세포에서 세포의 증식율이 증가했고 체외 세포의 이동성도 강화되었다 (Fig. 11C). MiR-148a 유사체를 도입하였을 때에는 간암세포의 증식율과 이동성이 감소하였다 (Fig. 11D). 또한 miR-148a의 저해제 도입은 간암세포의 증식을 촉진하였다. 이상의 결과는 miR-148a발현 저하에 따른 USP4의 발현 증가가 세포 표면 수용체로부터 전달되는 신호활성화에 기여하여 세포의 증식능과 이동성을 증가시킴을 시사한다.

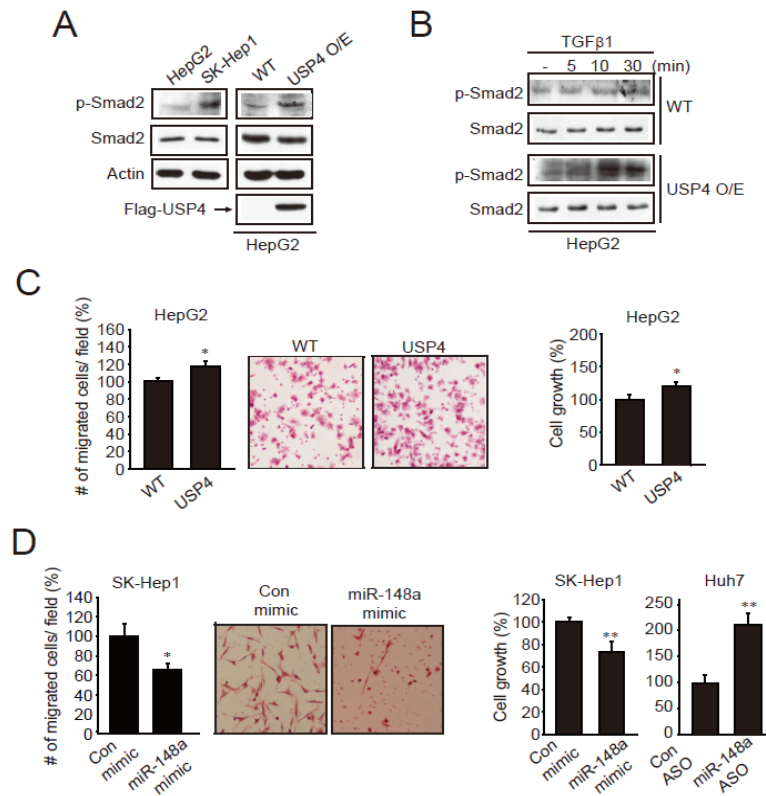


Figure 11. The effect of USP4 on tumor cell migration and growth

(A) Immunoblottings for phosphorylated or total Smad2.

(B) The expression of phosphorylated or total Smad2. WT cells or those stably overexpressing USP4 were treated with vehicle or TGFβ1 (2.5 ng/ml).

(C) The effect of stable overexpression of USP4 on cell migration and growth. Indicated cells were subjected to transwell migration assay or MTT assays.

(D) The effects of miR-148a modulations. Cells were transfected with control ASO (or mimic) and miR-148a ASO (or mimic), and were subjected to transwell migration assays or MTT.

For C and D, data represent the mean \pm SEM of at least 3 separate experiments
(significantly different from transfection control, *p<0.05, **p<0.01)

12. 종양 이식 동물 실험

임상에서 miR-148a와 USP4가 간세포암의 진행에 미치는 영향을 알아보고자, 환자에서 기인한 간암 이종이식 동물 모델(patient-driven xenograft, PDX)을 사용하였다. 세 명의 환자 중 두 명의 환자의 주변 정상조직 대비 간세포암조직에서 miR-148a의 발현이 감소하였다 (Fig. 12A). 병리학적 검사를 통해 각 단계에서의 암조직의 특성은 확인되었다 (data not shown, JW Park). 면역조직화학적 염색에서 miR-148a의 발현이 저하된 두 간세포암 환자에서는 주변 정상조직 대비 간세포암조직 및 환자의 종양을 마우스에 이식한 뒤 얻은 종양조직에서 USP4의 발현 증가가 관찰되었다 (Fig. 12B, #1 and #2). 세번째 환자는 주변 정상조직 대비 간세포암조직 및 마우스에 이식한 종양에서 miR-148a의 발현이 증가하였고 USP4의 발현은 증가하지 않았다. 간암 이종이식 동물 모델에서 miR-148a와 USP4는 강한 역상관성을 보였다 (Fig. 12C). G α 12의 발현이 저해된 종양 이식 동물에서 암세포의 성장이 감소함을 밝힌 선행연구 결과를(Yang *et al.*, 2015) 바탕으로 종양 성장이 억제된 세포주 또는 간세포암조직에서 miR-148a와 USP4의 발현을 관찰하였다. G α 12의 발현이 저해된 세포주에서 miR-148a의 증가를 관찰했으며 종양 이종이식 조직에서 USP4의 발현 감소를 관찰하였다 (Fig. 12D). 이러한 결과는 miR-148a의 감소에 따른 USP4의 발현 증가가 간암의 악성화에 기여할 것임을 시사한다.

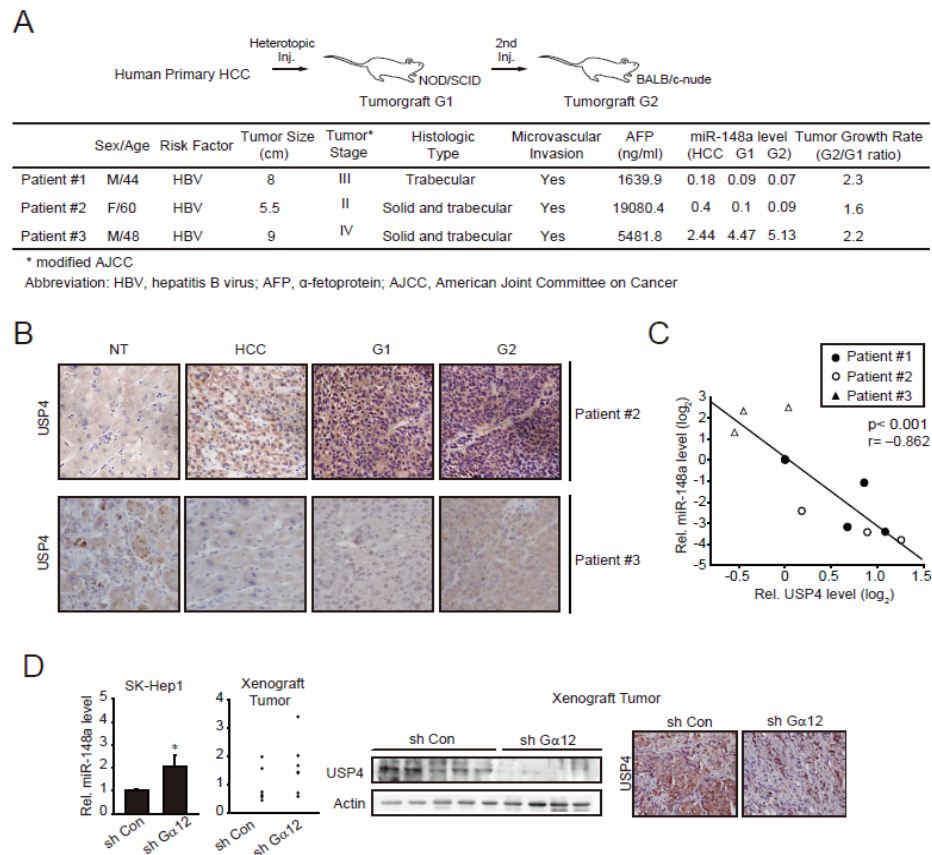


Figure 12. Analyses of miR-148a and its target expression levels in original HCC or engrafted tumors

(A) Clinical and pathological characteristics of donor patients. miR-148a levels were assessed using qRT-PCR assays and were normalized relative to U6 small RNA. miR levels in tumors were compared with NT samples. One or two paraffin blocks were made from G1 or G2 tumors, and the rest samples were used for tumor passages.

(B) Immunohistochemical analyses for USP4 in original HCC or engrafted tumors.

Shown above are the figures obtained from patient #2 and #3 ($\times 200$). The results from patient #1 and #2 were comparable to each other.

(C) Correlation analyses between miR-148a and USP4. U6 small RNA was used as control. (NT=1)

(D) Analyses of miR-148a and USP4 in xenograft tumors. qRT-PCR assays were done on SK-Hep1 cells transfected with control shRNA (sh C) or shRNA directed against G α 12 (sh G α 12) (N=3). sh C or G α 12 cells (1×10^7 each) were injected into the left flank of athymic nude mice. Of 8 or 9 tumors formed in each group at 8 weeks, qRT-PCR assays were done on the samples with sufficient amount (N=6 each). Tumor samples were used for immunoblottings (N=8-9 each) or immunohistochemistry ($\times 200$, representative figures were shown; N=4 each). Data represent the mean \pm SEM of 3 separate experiments (significantly different from transfection control or WT control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

IV. 고 찰

마이크로RNA는 간에서 세포의 생존과 사멸을 포함한 다양한 생물학적 기능을 조절한다. 특정 마이크로RNA의 발현 변화는 다양한 간질환의 발병 및 진행을 촉진한다(Wang *et al.*, 2012). 간세포는 간의 70% 이상을 차지하는 실질 세포로서 알코올의 대사가 이루어지며 알코올에 의한 직접적 간세포 손상이 크다(Mandrekar *et al.*, 2012). 알코올성 간염 환자의 간조직 마이크로RNA 마이크로어레이 데이터 분석 결과 전체 마이크로RNA 중 오직 2%의 마이크로RNA만이 현저히 감소했고, 이 중 miR-148a의 감소폭이 가장 컸다. 간세포에 풍부한 마이크로RNA의 변화는 알코올에 의한 간세포 손상을 심화시킬 수 있다. 또한 만성 간질환에서의 간세포 손상에 따른 반복적인 간세포의 괴사와 재생 및 염증 반응은 간세포암의 발생률을 높인다. 따라서 본 연구는 miR-148a의 발현 변화에 주목하여 알코올성 간질환 및 간세포암의 악성화에서 miR-148a의 역할과 조절 기전을 탐구하였다.

본 연구는 알코올성 간질환에서 miR-148a의 발현이 감소함을 간염 환자 및 동물모델을 통해 증명하였다. 또한 miR-148a의 발현 저하와 혈청 ALT (또는 TG)양은 음의 상관관계에 있음을 제시하였다. 이러한 현상과 miR-148a가 간세포의 분화를 조절해서 간기능 유지를 촉진한다는 보고는(Gailhouste *et al.*, 2013), miR-148a의 감소가 간세포 손상과 직접적인 관련이 있음을 뒷받침한다. 허혈 재관류 손상(ischemic reperfusion injury)시 간조직에서 miR-148a가 감소한다는 보고도 간세포 손상과 miR-148a의 상관성을 지지한다(Farid *et al.*, 2012). MiR-148a의 발현은 지방간 동물 모델에서 증가하며 저밀도지단백질 수용체(Low density lipoprotein

receptor)를 기질로 하여 혈 중 저밀도지단백의 양을 조절한다고 보고되었다(Goedeke *et al.*, 2015). 하지만 상기 보고에서 miR-148a의 억제제를 마우스에 투여하여도, 간세포내 지질 축적이 변하지 않는다는 결과로 볼 때 miR-148a가 간세포 내 지질 축적을 촉진하지는 않는 것으로 간주된다. 하지만 지방간에서의 miR-148a의 변화 및 그 조절 기전에 대한 연구는 더 필요한 것이다.

알코올성 간염 환자와 알코올 처치 동물 모델에서 관찰한 miR-148a와 FoxO1의 양의 상관성은 FoxO1과 miR-148a가 간질환 이행시 함께 변화할 가능성을 제시한다. FoxO는 스트레스 반응 기전에 관여하는 핵심 전사인자 중 하나로 포유류에는 4가지 타입의 FoxO 유전자가 존재한다(Gross *et al.*, 2008). 이 중 FoxO1은 간에서 대사조절자와 암억제유전자로 잘 알려져있다(Jung *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2006). 본 연구에서는 알코올성 간염 환자에서 감소하는 유전자들의 gene ontology 분석을 통해 ‘전사 조절’과 ‘세포죽음의 억제조절’에 관여하는 유전자들의 상호관계에 있어 핵심 유전자로 FoxO1을 도출하였다. 또한 알코올성 간염 환자 및 알코올 처리 동물 모델로 알코올에 의한 FoxO1의 발현 감소를 증명하였다. 지방세포에서 FoxO1의 발현 감소는 활성산소종과 염증성 사이토카인의 생성을 촉진한다(Subauste *et al.*, 2007). 유사하게 알코올과 불포화지방산을 간세포에 처리하면 핵 속의 FoxO1의 발현이 감소한다는 보고는 본 연구 결과를 지지한다(Liang *et al.*, 2011). 반면, Lieber-Decarli 알코올 식이를 한 랫트 모델에서는 FoxO1의 발현이 증가한다고 보고되었는데(Lieber *et al.*, 2008), 이는 종간의 차이에 따른 알코올 대사 반응 정도가 다르기 때문이라고 생각된다. FoxO1은 AKT에 의해 활성이 억제되며(Tzivion G *et al.*, 2011), 간세포암에서는 miR-135b에

의해 FoxO1의 발현이 감소된다고 보고되었다(Jung *et al.*, 2014). 일시적으로 알코올을 섭취한 마우스 동물 모델에서 AKT의 신호 증가가 보고되었다(Zeng *et al.*, 2012). 알코올성 간염 환자의 마이크로RNA 마이크로 어레이데이터 분석 결과 miR-135b는 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 본 연구에서 발견한 알코올에 의한 FoxO1의 감소가 AKT의 조절에 따른 FoxO1의 단백질 변화를 상위 조절로 변화되었음을 예측해 볼 수 있지만 전사적 조절에 관여하는 신호 회로를 포함하여 어떠한 신호 경로에 의해 FoxO1의 발현이 조절되는지에 대한 탐구가 더 필요하다.

본 연구에서는 FoxO1이 전사적으로 miR-148a의 발현을 증가시킴을 새롭게 제시하였다. SREBP-1, MYB, 그리고 p53이 miR-148a의 전사인자로 알려져 있지만(Goedeke *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011), 알코올성 간질환에서 이들 전사인자의 발현은 miR-148a의 발현 변화와 일치하지 않았다. 이는 알코올성 간질환에서 위 전사인자들이 아닌 다른 전사인자의 조절을 받음을 의미하며, 본 연구에서는 FoxO1과 miR-148a의 상관관계 분석을 토대로 세포 기반 실험을 통해 MIR148A 프로모터에 FoxO1이 결합하는 부위가 존재함을 증명하였다.

알코올성 간질환에서 FoxO1과 miR-148a의 발현저하를 바탕으로 간세포의 손상에 있어 miR-148a의 병리적 역할을 규명하기 위한 매개인자로 TXNIP를 제시하였다. TXNIP는 산화스트레스 및 독성 자극에 의한 세포 손상을 촉진한다(Kwon *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2010). 본 연구에서는 세포 기반 실험에서 miR-148a 유사체 도입으로 알코올 처리에 의해 증가된 TXNIP의 발현이 억제됨을 확인하였고 이는 miR-148a가 TXNIP를 통해 알코올성 간질환을 조절할 수 있음을 시사한다. 알코올성 간염 환자에서 TXNIP의 발현이 증가하는 경향을

보였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았는데 이는 전사 후 조절에 더 크게 관여하는 마이크로RNA의 특성에 기인했다고 볼 수 있다.

Inflammasome은 다단백 복합체로 세포 내 외의 자극에 의해 활성화되며 다양한 질환에 관여한다(Martinon *et al.*, 2002). NLRP3 inflammasome은 NLRP3, ASC, 그리고 pro-caspase-1으로 구성되며, 특정 대사체나 활성산소종과 같은 숙주에서 기인한 위험 신호들(host-derived danger signals)에 의해 활성화되면 pro-caspase-1이 caspase-1으로 잘려서 IL-1 β 와 IL-18의 분비를 촉진한다(Kono *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011). 알코올은 Kupffer 세포에서 inflammasome을 활성화시키고 염증성 사이토카인의 분비를 유도한다고 보고되었다(Petrasek *et al.*, 2012). 알코올 섭취에 의해 증가할 수 있는 내독소 자극(lipopolysaccharide)이 간세포에서 NLRP3의 발현을 증가시킨다는 보고는(Boaru *et al.*, 2012), NLRP3 inflammation 활성이 간세포에서 일어날 수 있음을 제시한다. 본 연구에서는 알코올에 의한 TXNIP의 발현 증가가 간세포내의 inflammasome 활성을 촉진할 수 있음을 발견하였다. 또한 알코올성 간염 환자의 GEO 데이터를 이용하여 FoxO1과 inflammasome 구성 단백질인 caspase-1 및 ASC가 역상관관계에 있음을 분석한 결과 및 FoxO1과 miR-148a 저해제를 사용하여 얻은 실험 결과들은, 알코올에 의한 FoxO1과 miR-148a의 감소가 TXNIP를 증가시키고 이는 NLRP3 inflammasome 활성화를 유도할 것이라는 가설을 지지한다.

간세포 손상시 다양한 기전에 의해 간세포 사멸이 촉진되며 이는 알코올성 간질환의 이행에서도 관찰된다. 지속적인 inflammasome의 활성화는 과도한 염증 반응을 일으키고 이는 세포의 죽음을 유도하게 된다(Bergsbaken *et al.*, 2009). Apoptotic한 세포 죽음을 억제하였음에도

알코올에 의한 간세포 손상이 나타났다는 보고는(Roychowdhury *et al.*, 2012), 알코올에 의한 간세포 손상에서 apoptosis가 아닌 다른 형태의 간세포 죽음 회로가 존재할 수 있음을 제시한다. 본 연구에서는 알코올에 의해 간세포내에서 증가한 TXNIP를 매개로 inflammasome 활성이 유도되며 이때, caspase-1 의존적으로 계획된 세포 죽음의 형태인 pyroptosis가 증가함을 발견하였다. 이는 알코올성 간염 환자의 간세포에서 caspase-1이 증가되어 있다는 보고와 일치한다(Peng *et al.*, 2014). 또한 TXNIP의 결손은 세포 증식을 촉진하고 세포 사멸에 저항한다는 보고와도 부합한다(Jeon *et al.*, 2005). 나아가 세포 실험을 통해 miR-148a 유사체 도입으로 알코올에 의한 세포 죽음이 억제된 결과는 miR-148a 및 이와 관련된 분자들이 알코올성 간질환의 새로운 타겟이 될 수 있음을 지지한다.

Inflammasome 구성 단백질 NLRP3, caspase-1, ASC, 그리고 IL-1 β 의 발현은 마크로파지를 억제한 뒤 알코올 식이를 한 마우스 간조직에서도 증가하였는데, 이는 간세포 내에서 알코올에 의한 inflammasome의 활성이 나타남을 의미한다. IL-1 β 의 분비는 알코올 섭취 군과 비교하여 마크로파지를 억제한 뒤 알코올 섭취를 한 군에서 감소하였는데, 이는 마크로파지에서의 inflammasome 억제에 기인했다고 볼 수 있다. 염증세포나 간성상세포와 같은 다른 유형의 세포가 알코올에 의한 inflammasome의 활성화에 영향을 미칠 수 있지만 그럼에도 불구하고, 마크로파지 제거 후에도 알코올에 처치에 의해 혈청 ALT 양이 증가되는 결과는, 적어도 알코올이 간세포내의 NLRP3 inflammasome의 활성화에 관여할 가능성을 시사한다. 렌티바이러스를 이용하여 간세포 선택적으로 miR-148a를 도입하였을 때 알코올에 의해 증가된 inflammasome 활성화

지표가 감소하고 알코올 단독 섭취 그룹에 비해 miR-148a가 도입된 그룹에서 혈액학적 지표들이 개선되는 결과는 이를 지지한다.

지속적인 과량의 알코올 섭취는 만성 간질환의 주요 원인이며 알코올성 간질환의 이행은 간세포암의 원인이 된다. 또한 바이러스성 간염 및 기저 간질환을 가진 환자가 알코올을 섭취하면 간세포암 발생의 위험은 더 높아진다(Morgan *et al.*, 2004). 본 연구에서는 miR-148a의 발현에 따른 간세포암 환자의 전체 생존률과 무재발생존률의 차이를 발견하였다. 미세혈관 침습은 간내 전이의 임상병리학적 지표로 사용되는데(Lim *et al.*, 2011) 이러한 미세혈관 침습이 있거나, 종양의 크기가 큰(>5cm) 간세포암 환자에서 miR-148a의 발현이 더 낮음을 발견하였다. 따라서, miR-148a의 발현 저하는 간세포암의 악성화에 기여할 것으로 사료된다. MiR-148a의 발현 저하는 대장암과 위암을 포함한 다른 암종에서도 보고되었다(Takahashi *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012). 또한, 자궁 내막 암에서도 miR-148a는 주변 정상조직 섬유아세포에서보다 낮았다(Aprelikova *et al.*, 2013). 간세포 특이적 마이크로RNA인 miR-148a가 성인 간에서 높게 발현된다는 점과(Gailhouse *et al.*, 2013), miR-148a 유사체 도입이 간세포암에서 CD90 및 CD44(암 줄기 세포 마커, cancer stem cell marker)의 발현을 감소시킨다는 보고는(Yan *et al.*, 2014), 간세포암에서의 miR-148a의 발현 감소가 간질 세포(stromal cell)보다는 간암 세포에서의 마이크로RNA 억제에 따른 결과로 보인다.

유비퀴틴 특이적 분해효소는 가장 큰 deubiquitinase 계열에 속하며 단백질의 번역 후 변형에 영향을 줄 수 있다(Fraile *et al.*, 2012). 유비퀴틴 특이적 분해효소의 발현 변화는 수용체 또는 신호 분자의 유비퀴틴

변형을 통해 암세포의 악성화에 관여하는 TGF- β 의 활성화에 영향을 줄 수 있다(De Boeck *et al.*, 2012). 특히, USP4는 세포 표면 수용체인 T β RI의 분해를 억제함으로써 그 발현을 지속적으로 유지시키거나 하위 신호를 활성화시킨다(Zhang *et al.*, 2012). 본 연구에서는 miR-148a의 발현 저하가 USP4의 증가와 상관성이 있으며, TNM 병기가 높은(TNM 병기 II-III) 간세포암 환자에서 USP4의 발현이 높음을 발견하였다. 또한 USP4의 발현은 중간엽성 간암세포주에서 더 증가해 있었는데, 이러한 결과는 USP4가 간세포암의 악성화에 관여할 수 있음을 시사한다. 본 연구에서는 miR-148a의 발현이 직접적으로 USP4의 발현을 억제할 수 있음을 세포 기반 실험으로 증명하였다. 전이가 있는 간세포암에서 miR-148a을 포함한 20종의 마이크로RNA 발현 저하가 보고 되었다(Budhu *et al.*, 2008). 또한 miR-140-5p에 저하에 따른 T β RI의 발현 증가는 간세포암의 전이를 촉진한다(Yang *et al.*, 2013). 따라서 miR-148a 및 다른 마이크로RNA(들)의 발현 억제를 통한 USP4 과발현 또는 TGF- β 신호 활성화는 간세포암의 진행을 촉진시킬 수 있다.

TGF- β 는 정상세포 또는 양성 종양에 있어서는 세포의 성장 저해를 유도하여 종양 억제제로 작용하지만, 암이 진행되면서 TGF- β 신호전달의 교란으로 인해 신호가 불활성화 되거나 세포주기의 비정상적 조절로 성장 저해에 저항성을 가지게 되면 오히려 암의 촉진제로 작용한다(Roberts *et al.*, 2003). 또한 진행성 암에서 TGF- β 에 의해 활성화된 신호 경로는 상피-중간엽성 이행을 유도하고, 암세포의 침습성과 전이성을 높인다(Sengupta *et al.*, 2014). 본 연구에서는 USP4의 과발현에 따라 Smad2 의 인산화가 증가하고 간암세포의 이동 및 성장이 촉진됨을 증명하였다. 상피중간엽성 이행은 E-cadherin 발현이 감소하고

암세포의 전이성이 높아지는 특징을 가진다(Thiery, 2002). 중간엽성 간암세포주에서 USP4의 발현 증가와 E-cadherin의 발현 감소가 양의 상관성을 보이는 것은 USP4가 간세포암의 전이성 증가에 관여함을 뒷받침한다. 하지만 USP4의 과발현이 상피-중간엽성 이행을 유도하지는 못했는데, 이는 간세포암의 단계 및 진행에 따라 miR-125b, miR-101와 같이 조절되지 않은 다양한 마이크로RNA가(Kim *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2009) 표현형 변화에 기여할 수 있기 때문으로 사료된다.

암환자에서 얻은 종양을 마우스에 이식한 이종이식 모델에서 높은 종양 생착률을 보인 암 조직을 가진 환자는 전반적인 생존율이 낮고 전이 가능성이 높았다(Garrido-Laguna *et al.*, 2011). 본 연구에서는 간세포암 환자의 종양 조직을 마우스에 이식하여 얻은 암 조직에서, miR-148a의 발현이 낮을 때 이식된 종양에서 USP4의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다. 이는 종양이식 단계에서의 성공적인 암 조직 생착에 USP4 증가와 miR-148a의 감소가 연관되어 있을 가능성을 제시한다. 또한 miR-148a 발현 감소와 그에 따른 USP4의 발현 증가가 간세포암의 진행 및 악성화에 주요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 하나의 마이크로RNA는 다양한 타겟을 조절할 수 있다. MiR-148a는 위암, 대장암, 그리고 간세포암에서 bcl-2, rho-associated protein kinase 1, c-Myc, 그리고 HPIP를 조절한다고 보고되었다(Lujambio *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2011). 따라서 USP4는 암세포의 성장과 전이를 위해 앞서 언급한 분자들과 함께 작용할 수 있을 것으로 생각된다.

간세포암에서 FoxO1의 발현 저하가 간세포암의 악성화에 관여한다고 보고되었다(Jung *et al.*, 2014). 이를 토대로 간세포암 환자의 시료에서 FoxO1과 miR-148a의 상관성 분석을 진행하여 양의 상관관계를

확인하였으며 이는 알코올성 간손상 모델에서 밝힌 FoxO1에 의한 miR-148a의 전사적 변화가 간세포암에도 적용될 수 있음을 의미한다. 또한 FoxO1의 발현과 USP4의 발현이 역상관성을 나타내었는데 이는 FoxO1과 miR-148을 매개하여 USP4의 발현이 변화될 수 있음을 지지한다. 또한 Gα12의 발현이 저하된 xenograft 동물 모델에서 miR-148a의 발현이 증가하고 USP4의 발현이 저하된 결과와 Gα12에 의해 FoxO1의 발현이 저하된다는 보고를 종합하면, Gα12 하위로 FoxO1을 매개하여 miR-148a의 발현이 저하될 것으로 예측되며 이 신호 회로에 의해 간세포암의 악성화가 촉진되는 것으로 사료된다. 이는 Gα12가 상피 중간엽성 이행을 매개하여 간세포암의 악성화를 촉진한다는 연구 결과와 부합한다(Yang *et al.*, 2015).

알코올성 간질환 이행, 특히 사망률이 높은 알코올성 간염의 치료에 있어 표적 타겟 또는 생존율을 유의적으로 증가시키는 약제는 부족하다. 본 연구에서는 알코올에 의해 miR-148a의 발현이 저하되어 TXNIP의 발현증가가 나타나며 이는 NLRP3 inflammasome 활성화를 유도하여 pyroptosis를 촉진시킴을 밝혔다. MiR-148a의 간세포 특이적 발현을 통해 알코올성 간질환이 개선됨을 증명하였다. 알코올에 의해 유도된 pyroptosis의 조절 인자로서 miR-148a의 도출과 전사인자인 FoxO1의 발현은 알코올성 간질환의 효과적인 치료 타겟 또는 치료 전략이 될 수 있다고 사료된다.

간세포암은 간내 전이 또는 폐나 뼈 등으로의 타 장기 전이로 재발이 빈번하며, 이는 간세포암 환자의 높은 사망률의 원인이 된다(Poon *et al.*, 2000). MiR-148a의 발현 감소는 간세포 암종의 불량한 예후와 관련이 있으며, USP4 발현 증가는 TGF-β 신호 전달 회로를 촉진함으로써

종양세포의 성장 및 이동을 강화하여 간세포암의 진행에 기여한다고 보여진다. 따라서 miR-148a 또는 USP4는 진행성 간세포암의 새로운 치료 타겟이 될 수 있다.

TXNIP는 암세포에서 종양억제제로 보고되었다(Wei *et al.*, 2017). 본 연구에서는 알코올성 간질환에서 miR-148a의 신호 회로에 의해 pyroptosis인 세포 죽음을 관찰하였는데 miR-148a의 감소가 동시에 나타나는 간세포암에서는 miR-148a의 감소에 따른 암세포의 증식을 살펴볼 수 있다. 이러한 차이는 pyroptosis를 일으키는 caspase의 하위 신호 분자로 보고된 gasderminE의 발현 유무에 따른 변화로 생각해 볼 수 있다. Gasdermin은 inflammasome에 의해 활성화 되며 pyroptosis에 의해 세포 죽음이 나타날 때 세포벽에 구멍(pore)을 만들어 세포 죽음을 유도한다(He *et al.*, 2015). 최근 gasdermin E는 정상 세포에서는 관찰가능 하지만 대부분의 암세포에서 그 발현을 현저히 낮다고 보고되었다(Wang *et al.*, 2017). 또한 TGF- β 신호 회로가 암세포와 정상세포에서 세포 죽음에 관여하는 현상이 다른 것처럼 TXNIP도 세포 주기와 관련된 신호 분자의 차별적 활성화에 따라 세포 죽음이 달라질 수 있을 것으로 사료되나 추후 연구가 필요하다.

결론적으로, 알코올에 의해 손상된 간세포 및 진행성 간세포암에서 miR-148a의 발현이 저하되어 있다. 이에 따라 알코올성 간질환에서는 TXNIP를 매개한 NLRP3 inflammasome 신호를 활성화가 유도되어 간세포의 손상이 촉진되었고 이는 miR-148a의 도입으로 개선되었다. 간세포암의 진행에 있어 miR-148a의 감소는 USP4를 직접적으로 유도하여 간암 세포의 이동과 성장을 촉진시켰다. 이상의 결과는 miR-148a가 알코올성 간질환 및 간세포암의 치료를 위한 효과적인 약물

작용점이 될 수 있음을 제시한다.

V. 참고 문헌

- Aggarwal, K. and Massagué, J. (2012). Ubiquitin removal in the TGF- β pathway. *Nature cell biology*, 14(7), 656-657.
- Aprelikova, O., Palla, J., Hibler, B., Yu, X., Greer, Y., Yi, M., Stephens, R., Maxwell, G., Jazaeri, A., and Risinger, J. (2013). Silencing of miR-148a in cancer-associated fibroblasts results in WNT10B-mediated stimulation of tumor cell motility. *Oncogene*, 32(27), 3246-3253.
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., Lobenhofer, E. K., Sharon, E., Shibolet, Y. M., Shtutman, M., Bentwich, Z., and Einat, P. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome research*, 14(12), 2486-2494.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., and Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews microbiology*, 7(2), 99-109.
- Boaru, S. G., Borkham-Kamphorst, E., Tihaa, L., Haas, U., and Weiskirchen, R. (2012). Expression analysis of inflammasomes in experimental models of inflammatory and fibrotic liver disease. *Journal of inflammation*, 9(1), 1.
- Borel, F., Konstantinova, P., and Jansen, P. L. (2012). Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 56(6), 1371-1383.
- Brandon-Warner, E., Schrum, L. W., Schmidt, C. M., and McKillop, I. H. (2012). Rodent models of alcoholic liver disease: of mice and men. *Alcohol*, 46(8),

715-725.

- Budhu, A., Jia, H. L., Forgues, M., Liu, C. G., Goldstein, D., Lam, A., Zanetti, K. A., Ye, Q. H., Qin, L. X., and Croce, C. M. (2008). Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 47(3), 897-907.
- Colmenero, J., Bataller, R., Sancho-Bru, P., Bellot, P., Miquel, R., Moreno, M., Jares, P., Bosch, J., Arroyo, V., and Caballería, J. (2007). Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity. *Gastroenterology*, 132(2), 687-697.
- De Boeck, M., and Ten Dijke, P. (2012). Key role for ubiquitin protein modification in TGF β signal transduction. *Upsala journal of medical sciences*, 117(2), 153-165.
- Elliott, R. L., and Blobe, G. C. (2005). Role of transforming growth factor β in human cancer. *Journal of clinical oncology*, 23(9), 2078-2093.
- Fraile, J., Quesada, V., Rodriguez, D., Freije, J., and López-Otín, C. (2012). Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene*, 31(19), 2373-2388.
- Gailhouse, L., Gomez-Santos, L., Hagiwara, K., Hatada, I., Kitagawa, N., Kawaharada, K., Thirion, M., Kosaka, N., Takahashi, R. u., and Shibata, T. (2013). miR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology*, 58(3), 1153-1165.
- Gao, B. and Bataller, R. (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*, 141(5), 1572-1585.

- Garrido-Laguna, I., Uson, M., Rajeshkumar, N., Tan, A. C., De Oliveira, E., Karikari, C., Villaroel, M. C., Salomon, A., Taylor, G., and Sharma, R. (2011). Tumor engraftment in nude mice and enrichment in stroma-related gene pathways predict poor survival and resistance to gemcitabine in patients with pancreatic cancer. *Clinical cancer research*, 17(17), 5793-5800.
- Geng, Y., Ma, Q., Liu, Y.-N., Peng, N., Yuan, F.-F., Li, X.-G., Li, M., Wu, Y.-S., Li, B.-l., and Song, W.-b. (2015). Heatstroke induces liver injury via IL-1 β and HMGB1-induced pyroptosis. *Journal of hepatology*, 63(3), 622-633.
- Giordano, S. and Columbano, A. (2013). MicroRNAs: new tools for diagnosis, prognosis, and therapy in hepatocellular carcinoma? *Hepatology*, 57(2), 840-847.
- Goedeke, L., Rotllan, N., Canfrán-Duque, A., Aranda, J. F., Ramírez, C. M., Araldi, E., Lin, C.-S., Anderson, N. N., Wagschal, A., and de Cabo, R. (2015). MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. *Nature medicine*, 21(11), 1280-1289.
- Goodnough, J. B., Ramos, E., Nemeth, E., and Ganz, T. (2012). Inhibition of hepcidin transcription by growth factors. *Hepatology*, 56(1), 291-299.
- Gross, D. N., van den Heuvel, A. P., and Birnbaum, M. J. (2008). The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene*, 27(16), 2320-2336.
- He, W. T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., and Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell research*, 25(12), 1285-1298.
- Hwahng, S. H., Ki, S. H., Bae, E. J., Kim, H. E., and Kim, S. G. (2009). Role of

adenosine monophosphate-activated protein kinase-p70 ribosomal S6 kinase-1 pathway in repression of liver X receptor-alpha-dependent lipogenic gene induction and hepatic steatosis by a novel class of dithiolethiones. *Hepatology*, 49(6), 1913-1925.

Iracheta-Vellve, A., Petrasek, J., Satishchandran, A., Gyongyosi, B., Saha, B., Kodys, K., Fitzgerald, K. A., Kurt-Jones, E. A., and Szabo, G. (2015). Inhibition of sterile danger signals, uric acid and ATP, prevents inflammasome activation and protects from alcoholic steatohepatitis in mice. *Journal of hepatology*, 63(5), 1147-1155.

Jeon, J.-H., Lee, K.-N., Hwang, C. Y., Kwon, K.-S., You, K.-H., and Choi, I. (2005). Tumor suppressor VDUP1 increases p27kip1 stability by inhibiting JAB1. *Cancer research*, 65(11), 4485-4489.

Jou, J. and Diehl, A. M. (2010). Epithelial-mesenchymal transitions and hepatocarcinogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), 1031-1034.

Jung, H. S., Seo, Y. R., Yang, Y. M., Koo, J. H., An, J., Lee, S. J., Kim, K. M., and Kim, S. G. (2014). Galpha12gep oncogene inhibits FOXO1 in hepatocellular carcinoma as a consequence of miR-135b and miR-194 dysregulation. *Cell Signal*, 26(7), 1456-1465.

Khoruts, A., Stahnke, L., McClain, C. J., Logan, G., and Allen, J. I. (1991). Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology*, 13(2), 267-276.

Kim, J. K., Noh, J. H., Jung, K. H., Eun, J. W., Bae, H. J., Kim, M. G., Chang, Y. G., Shen, Q., Park, W. S., and Lee, J. Y. (2013). Sirtuin7 oncogenic potential in

- human hepatocellular carcinoma and its regulation by the tumor suppressors miR-125a-5p and miR-125b. *Hepatology*, 57(3), 1055-1067.
- Kishi, Y., Hasegawa, K., Sugawara, Y., and Kokudo, N. (2011). Hepatocellular Carcinoma: Current Management and Future Development—Improved Outcomes with Surgical Resection. *International journal of hepatology*, 2011.
- Kono, H., Chen, C.-J., Ontiveros, F., and Rock, K. L. (2010). Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. *The Journal of clinical investigation*, 120(6), 1939-1949.
- Kwon, H.-J., Lim, J.-H., Han, J.-T., Lee, S.-B., Yoon, W.-K., Nam, K.-H., Choi, I.-P., Kim, D.-Y., Won, Y.-S., and Kim, H.-C. (2010). The role of vitamin D3 upregulated protein 1 in thioacetamide-induced mouse hepatotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 248(3), 277-284.
- Li, S., Fu, H., Wang, Y., Tie, Y., Xing, R., Zhu, J., Sun, Z., Wei, L., and Zheng, X. (2009). MicroRNA-101 regulates expression of the v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS) oncogene in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 49(4), 1194-1202.
- Liang, X., Hu, M., Rogers, C. Q., Shen, Z., and You, M. (2011). Role of SIRT1-FoxO1 signaling in dietary saturated fat-dependent upregulation of liver adiponectin receptor 2 in ethanol-administered mice. *Antioxidants and redox signaling*, 15(2), 425-435.
- Liangpunsakul, S., Haber, P., and McCaughan, G. W. (2016). Alcoholic liver disease in Asia, Europe, and North America. *Gastroenterology*, 150(8), 1786-1797.

- Lieber, C. S., Leo, M. A., Wang, X., and DeCarli, L. M. (2008). Effect of chronic alcohol consumption on Hepatic SIRT1 and PGC-1 α in rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 370(1), 44-48.
- Lim, K.-C., Chow, P. K.-H., Allen, J. C., Chia, G.-S., Lim, M., Cheow, P.-C., Chung, A. Y., Ooi, L. L., and Tan, S.-B. (2011). Microvascular invasion is a better predictor of tumor recurrence and overall survival following surgical resection for hepatocellular carcinoma compared to the Milan criteria. *Annals of surgery*, 254(1), 108-113.
- Lujambio, A., Calin, G. A., Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Blanco, D., Montuenga, L. M., Rossi, S., Nicoloso, M. S., and Faller, W. J. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(36), 13556-13561.
- Mandrekar, P. and Ambade, A. (2012). Cellular signaling pathways in alcoholic liver disease. *Gastroenterology publications and presentations*. 100
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular cell*, 10(2), 417-426.
- Miñana, J. B., Gómez-Cambronero, L., Lloret, A., Pallardó, F. V., Del Olmo, J., Escudero, A., Rodrigo, J. M., Pellín, A., Viña, J. R., and Viña, J. (2002). Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: a dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*, 35(5), 1205-1214.
- Morgan, T. R., Mandayam, S., and Jamal, M. M. (2004). Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5), S87-S96.

- Muraoka, R. S., Dumont, N., Ritter, C. A., Dugger, T. C., Brantley, D. M., Chen, J., Easterly, E., Roebuck, L. R., Ryan, S., and Gotwals, P. J. (2002). Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *The Journal of clinical investigation*, *109*(12), 1551-1559.
- Orman, E. S., Odena, G., and Bataller, R. (2013). Alcoholic liver disease: pathogenesis, management, and novel targets for therapy. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *28*(S1), 77-84.
- Orrego, H., Blake, J., Blendis, L., and Medline, A. (1987). Prognosis of alcoholic cirrhosis in the presence and absence of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology*, *92*(1), 208-214.
- Park, M. J., Kim, D. I., Lim, S. K., Choi, J. H., Kim, J. C., Yoon, K. C., Lee, J. B., Lee, J. H., Han, H. J., Choi, I. P., Kim, H. C., and Park, S. H. (2014). Thioredoxin-interacting protein mediates hepatic lipogenesis and inflammation via PRMT1 and PGC-1 α regulation in vitro and in vivo. *Journal of hepatology*, *61*(5), 1151-1157.
- Peng, Y., French, B. A., Tillman, B., Morgan, T. R., and French, S. W. (2014). The inflammasome in alcoholic hepatitis: Its relationship with Mallory–Denk body formation. *Experimental and molecular pathology*, *97*(2), 305-313.
- Petrasek, J., Bala, S., Csak, T., Lippai, D., Kodys, K., Menashy, V., Barrieau, M., Min, S.-Y., Kurt-Jones, E. A., and Szabo, G. (2012). IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *The Journal of clinical investigation*, *122*(10), 3476-3489.
- Poon, R. T.-P., Fan, S.-T., and Wong, J. (2000). Risk factors, prevention, and management of postoperative recurrence after resection of hepatocellular

- carcinoma. *Annals of surgery*, 232(1), 10-24.
- Roychowdhury, S., Chiang, D. J., Mandal, P., McMullen, M. R., Liu, X., Cohen, J. I., Pollard, J., Feldstein, A. E., and Nagy, L. E. (2012). Inhibition of apoptosis protects mice from ethanol-mediated Acceleration of Early Markers of CCl4-induced fibrosis but not steatosis or inflammation. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 36(7), 1139-1147.
- Sengupta, S., Jana, S., and Bhattacharyya, A. (2014). TGF- β -Smad2 dependent activation of CDC 25A plays an important role in cell proliferation through NFAT activation in metastatic breast cancer cells. *Cell signal*, 26(2), 240-252.
- Shukla, S. D., Pruett, S. B., Szabo, G., and Arteel, G. E. (2013). Binge ethanol and liver: new molecular developments. *Alcoholism: clinical and experimental research*, 37(4), 550-557.
- Subauste, A. R. and Burant, C. F. (2007). Role of FoxO1 in FFA-induced oxidative stress in adipocytes. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*, 293(1), E159-E164.
- Szabo, G. and Bala, S. (2013). MicroRNAs in liver disease. *Nature reviews gastroenterology and hepatology*, 10(9), 542-552.
- Szabo, G. and Csak, T. (2012). Inflammasomes in liver diseases. *Journal of hepatology*, 57(3), 642-654.
- Takahashi, M., Cuatrecasas, M., Balaguer, F., Hur, K., Toiyama, Y., Castells, A., Boland, C. R., and Goel, A. (2012). The clinical significance of miR-148a as a predictive biomarker in patients with advanced colorectal cancer. *PLoS one*, 7(10), e46684.

- Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews cancer*, 2(6), 442-454.
- Thorgeirsson, S. S. and Grisham, J. W. (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature genetics*, 31(4), 339-346.
- Tzivion, G., Dobson, M., Ramakrishnan, G. (2011) FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(11), 1938-1945.
- Wang, X. W., Heegaard, N. H., and Ørum, H. (2012). MicroRNAs in liver disease. *Gastroenterology*, 142(7), 1431-1443.
- Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Kun, Wang., Feng, Shao. (2017). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a Gasdermin. *Nature*, 547(7661), 99-103.
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Banerjee, S., Azmi, A. S., Kong, D., & Sarkar, F. H. (2011). Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(1), 27-33.
- Wei, M., Jiao, D., Han, D., Wu, J., Wei, F., Zheng, G., Guo, Z., Xi, W., Yang, F., Xie, P., Zhang, L., Yang, AG., Wang, H., Qin, W., Wen, W. (2017). Knockdown of RNF2 induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells through the upregulation of TXNIP. *Oncotarget*, 8(3), 5323.
- Wree, A., Eguchi, A., McGeough, M. D., Pena, C. A., Johnson, C. D., Canbay, A., Hoffman, H. M., and Feldstein, A. E. (2014). NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology*, 59(3), 898-910.
- Wu, D. and Cederbaum, A. I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical

- damage. *Alcohol research and health*, 27, 277-284.
- Xu, X., Fan, Z., Kang, L., Han, J., Jiang, C., Zheng, X., Zhu, Z., Jiao, H., Lin, J., and Jiang, K. (2013). Hepatitis B virus X protein represses miRNA-148a to enhance tumorigenesis. *The Journal of clinical investigation*, 123(2), 630-645.
- Yan, H., Dong, X., Zhong, X., Ye, J., Zhou, Y., Yang, X., Shen, J., and Zhang, J. (2014). Inhibitions of epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cells-like properties are involved in miR-148a-mediated anti-metastasis of hepatocellular carcinoma. *Molecular carcinogenesis*, 53(12), 960-969.
- Yang, H., Fang, F., Chang, R., and Yang, L. (2013). MicroRNA-140-5p suppresses tumor growth and metastasis by targeting transforming growth factor β receptor 1 and fibroblast growth factor 9 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 58(1), 205-217.
- Yang, M. H., Chen, C. L., Chau, G. Y., Chiou, S. H., Su, C. W., Chou, T. Y., Peng, W. L., and Wu, J. C. (2009). Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 50(5), 1464-1474.
- Yang, Y. M., Lee, W. H., Lee, C. G., An, J., Kim, E. S., Kim, S. H., Lee, S.K., Lee, C. H., Dhanasekaran, D. N., Moon, A., Hwang, S., Lee, S. J., Park, J.W., Kim, K. M., and Kim, S.G. (2015). Gal2 gep oncogene deregulation of p53-responsive microRNAs promotes epithelial–mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 34(22), 2910-2921.
- Zeng, T., Zhang, C. L., Song, F. Y., Zhao, X. L., Yu, L. H., Zhu, Z. P., and Xie, K. Q. (2012). PI3K/Akt pathway activation was involved in acute ethanol-

- induced fatty liver in mice. *Toxicology*, 296(1), 56-66.
- Zhang, H., Li, Y., Huang, Q., Ren, X., Hu, H., Sheng, H., and Lai, M. (2011). MiR-148a promotes apoptosis by targeting Bcl-2 in colorectal cancer. *Cell death and differentiation*, 18(11), 1702-1710.
- Zhang, L., Zhou, F., Drabsch, Y., Gao, R., Snaar-Jagalska, B. E., Mickanin, C., Huang, H., Sheppard, K.-A., Porter, J. A., and Lu, C. X. (2012). USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor. *Nature cell biology*, 14(7), 717-726.
- Zhang, W., Patil, S., Chauhan, B., Guo, S., Powell, D. R., Le, J., Klotsas, A., Matika, R., Xiao, X., and Franks, R. (2006). FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression. *Journal of biological chemistry*, 281(15), 10105-10117.
- Zheng, B., Liang, L., Wang, C., Huang, S., Cao, X., Zha, R., Liu, L., Jia, D., Tian, Q., and Wu, J. (2011). MicroRNA-148a suppresses tumor cell invasion and metastasis by downregulating ROCK1 in gastric cancer. *Clinical cancer research*, 17(24), 7574-7583.
- Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature immunology*, 11(2), 136-140.
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), 221-225.
- Zhu, A., Xia, J., Zuo, J., Jin, S., Zhou, H., Yao, L., Huang, H., and Han, Z. (2012). MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA

methyltransferase 1 in gastric cancer. *Medical oncology*, 29(4), 2701-2709.

VI. Abstract

MiR-148 as an inhibitory regulator of hepatocyte injury and hepatocellular carcinoma progression

Mi Jeong Heo

Advisor: Prof. Sang Geon Kim

MicroRNAs (miRNAs) regulate cell survival, death, regeneration, and inflammation, which is related to the progression of chronic liver disease. Moreover, dysregulation of miRNAs affects the prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC). However, there is a lack of research on miRNA as a regulator of chronic liver disease and HCC progression. Therefore, it is necessary to study the role of miRNA and its mediators that are involved in chronic liver disease and HCC progression.

Excessive alcohol intakes lead to alcoholic liver disease (ALD), including fatty liver, hepatitis, liver cirrhosis, and HCC, which is a major cause of chronic liver disease. Alcoholic hepatitis (AH) is accompanied by hepatic fibrosis, which leads to liver cirrhosis and progresses to liver cancer. HCC is one of poor prognostic tumors, and becomes frequently aggressive due to frequent metastasis. However, good diagnostic markers, drug targets and therapeutic strategies are still insufficient for successful treatment of ALD or HCC. Thus, this study investigated the novel miRNA that can inhibit hepatocyte injury and HCC progression and explored the pathophysiological function and regulatory mechanism. The specific aims were 1)

to analyze the alteration of miRNA by alcohol using AH patients and alcohol consumption animal models and to examine the alcohol induced hepatocyte injury mechanism, 2) to investigate the mechanism of HCC progression through the analysis of miRNA and its target using HCC patients and xenografts animals.

In AH patients and alcohol-fed animal models, the levels of miR-148a were decreased. The analysis of microarray data of AH patients revealed forkhead box protein O1 (FoxO1) as a key molecule of the signaling pathway disturbed by alcohol. In cell based and animal models, the levels of FoxO1 were suppressed by alcohol treatment, which correlated with miR-148a levels. FoxO1 was identified as a transcription factor of MIR148A. MiR-148a directly inhibited the expression of thioredoxin interacting protein (TXNIP). Increased expression of TXNIP by alcohol promoted the activation of NLRP3 inflammasome and induced pyroptosis of hepatocytes, which was decreased by miR-148a overexpression or suppression of TXNIP. Hepatocyte-specific lentiviral delivery of miR-148a to mice attenuated alcohol induced liver injury.

The levels of miR-148a were decreased in HCC patients with microvascular invasion (MVI) compare to non-MVI HCC patients. Moreover, miR-148a discriminate the overall survival and recurrence-free survival rate of HCC patients. The expression of ubiquitin specific protease 4 (USP4) was increased in patients with HCC. In cell based assay, miR-148a directly inhibited USP4. The induction of USP4 by dysregulation of miR-148a was remarkable in mesenchymal liver cancer cell line, which promoted the migration and proliferation of cancer cells. Inverse correlation between miR-148a and USP4 was confirmed in HCC patients and xenograft models. In a heterotropic patient-derived HCC xenograft model, the

levels of USP4 were also increased in G1 and G2 tumors when miR-148a was decreased, reflecting the closer link between miR-148a and USP4 for a shift in the expansion phase of tumorgraft.

In conclusion, this study verified pathophysiologic role and mechanism of miR-148a as an inhibitory regulator of hepatocyte injury and HCC progression. Alcohol markedly decreases miR-148a expression in hepatocytes through FoxO1, facilitating TXNIP overexpression and inflammation-related cell death. In addition, the miR-148a signaling pathway is linked and contribute to HCC progression. These findings provide information on understanding the liver diseases progression and elucidating the novel targets for therapy of liver disease.

Keywords: alcoholic liver disease, FoxO1, hepatocellular carcinoma, inflammasome, migration, miR-148a, proliferation, pyroptosis, TXNIP, USP4

Student ID Number: 2012-31115